

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DENTÁRIAS PROVOCADAS PELO RUÍDO INDUSTRIAL

Maria Alzira Alfaiate Moreira Cavacas

Dissertação de doutoramento em Ciências Médicas

2014

MARIA ALZIRA ALFAIATE MOREIRA CAVACAS

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DENTÁRIAS PROVOCADAS PELO RUÍDO INDUSTRIAL

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientação científica pelo Professor Doutor Vítor GlaziouTavares, professor do Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz e co-orientação pelo Professor Doutor Artur Águas, professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar.

Aos meus pais

Aos meus filhos, Nicole, Alexandre e Luís

Ao meu marido

Os meus pilares

ÍNDICE

Agradecimentos	7
Preâmbulo	17
I – Introdução.....	19
Ruído ambiental e saúde	21
Som e Ruído, Ruído Industrial, Ruído de Baixa Frequência (RBF)	22
Avaliação e Quantificação do Ruído	24
Alterações induzidas pelo RBF/Ruído Industrial	26
O Dente	28
<i>Esmalte</i>	31
<i>Dentina</i>	34
Propriedades físicas da dentina	34
Propriedades químicas da dentina	34
Papel / Função dos componentes da matriz na mineralização da dentina	35
Tipos de dentina	36
Inervação da dentina	47
<i>Polpa</i>	48
<i>Morfologia e actividade dos odontoblastos</i>	49
<i>Dinâmica do complexo pulpo-dentinário</i>	53
<i>Envelhecimento do dente</i>	55
<i>Particularidades do sistema estomatognático do rato Wistar</i>	57
Ruído Industrial e Stress	59
Hábitos Parafuncionais	62
Desgaste dentário	65

II – Objectivos	69
III – Material e Métodos	71
Modelo Animal	73
Protocolo Experimental	73
Macroscopia	75
Microscopia Ótica	76
Morfometria	76
Análise estatística	77
Microscopia Electrónica de Varrimento por Emissão de Campo (FESEM)	78
Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	78
Microscopia electrónica de varrimento por emissão de campo na lente (FEI-SEM) e <i>Immunogold</i>	80
IV – Resultados	85
Macroscópicos	87
Histológicos	89
Morfometria	92
Microscopia electrónica de varrimento por emissão de campo (FESEM)	96
Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	101
Microscopia electrónica de varrimento por emissão de campo na lente (FEI-SEM) e <i>Immunogold</i>	104
V – Discussão	113
VI – Conclusões	133
VII – Resumos	137
VIII – Referências Bibliográficas	155
IX – Anexos	189

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Vítor Glaziou Tavares,

Pela orientação deste trabalho, pelo apoio e pela amizade que prevalece desde
1989.

Ao Professor Doutor Artur Águas,

Para além da co-orientação deste trabalho, agradeço-lhe as palavras de incentivo e recordo a forma acolhedora com que sempre fui recebida na sua Instituição.

O meu muito obrigado.

Ao Professor Doutor Martins dos Santos

Senhor Professor,

Ao longo destes anos senti que todos os dias aprendi alguma coisa consigo. Devo-lhe muito e sinto-me privilegiada por fazer parte de um grupo que admira o seu Mestre.

Vejo em si o exemplo. O rigor e exigência que tem para com os seus foram sempre equilibrados com a sua amizade e fidelidade.

O respeito, a admiração e a estima que tenho por si, Sr. Professor, não cabem neste agradecimento e sei que perdurarão para além do meu percurso académico.

Este estudo não teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas. Não posso, por isso, deixar de agradecer:

Aos meus colegas e amigos do departamento de Anatomia:

Ao Professor Dr. Pedro Oliveira agradeço a sua imprescindível ajuda nas revisões e co-autoria dos textos e manuscritos. Quero ainda deixar expressa a minha gratidão pela forma voluntária e altruísta com que me ajudou.

Ao Professor Dr. José Grillo Evangelista pelo companheirismo e ajuda na contagem do *Immunogold*.

Professor Dr. Carlos Zagalo Ribeiro, foi pela sua mão que cheguei ao Departamento de Anatomia;

Ao Mestre António José de Sousa pelo apoio e incentivo.

Ao Professor Dr. Eduardo Antunes, com o qual caminhei quase lado a lado e contei sempre com as suas palavras de incentivo.

À Professora Dra. M^a João Oliveira pelos animais de experiência e por toda a colaboração e amizade.

Ao Sr. Duarte Monteiro, do ICBAS, pela ajuda na recolha dos animais de experiência.

Ao Gonçalo Borrecho agradeço a sua imprescindível colaboração e preparação histológica das amostras.

Ao Professor Doutor José Brito, do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, pela análise estatística dos dados morfométricos.

Ao Professor Doutor Jorge Perdigão pela participação numa parte deste estudo, pelos seus ensinamentos e também pela “porta” que me abriu para a minha formação em Bolonha.

À Mestre Ana Sezinando agradeço a participação na observação das amostras de FESEM na Universidade do Minnesota, Estados Unidos da América.

À Professora Dra. Ana Paula Serro pela “ponte” para o EDS no Instituto Superior Técnico.

Na Universidade de Bolonha encontrei um Departamento de Anatomia que me recebeu de braços abertos, que me transmitiu os seus conhecimentos e partilhou a sua

experiência na técnica de *immunogold*. Em particular ao Professor Lorenzo Breschi, ao Professor Pietro Gobbi, ao Dr. Fernando Nato, à Dra. Annalisa e à Dra. Gabriella.

No departamento de Histologia e Embriologia devo uma palavra de agradecimento:

À Dra. Eduarda Marques Silva que, muito para além dos conhecimentos e ensinamentos, me deu também sábios conselhos nas longas conversas que tivemos.

Ao Dr. Camisão, à Dra Luísa Pinto Coelho e à Dra. Luísa Ganço pelo companheirismo que encontrei no Departamento de Histologia. A todos devo uma palavra de agradecimento pela forma como sempre tentaram “aliviar” as minhas tarefas.

Ao Professor Dr. José João Baltazar Mendes, pelo apoio, amizade e incentivo.

Ao Professor Dr. Jorge da Fonseca pelas palavras de apoio e motivação.

Ao Professor Dr. Mário Polido com quem sempre contei com uma palavra de motivação.

À Dra. Margarida Lima pelas inúmeras vezes que, de uma ou de outra forma, contei com a sua pronta colaboração.

À Sónia e à Rosarinho, minhas colaboradoras na Clínica dos Álamos, pela boa vontade com que sempre se mostraram disponíveis para responder às muitas solicitações nas minhas ausências, assegurando a “retaguarda” em muitos momentos.

Aos meus doentes, que me mostraram que a consulta de Medicina dentária pode ir muito para além do acto clínico.

Para os meus alunos quero deixar uma palavra de agradecimento pelo que me ensinaram. Permitiram-me que aprendesse com eles durante estes 19 anos de docência em que procurei transmitir algum do meu conhecimento e, diariamente, percebi que levava comigo muitos ensinamentos resultantes da relação interactiva que acredito existir na sala de aula e que torna tão gratificante os nossos papéis.

Ao ICBAS e ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, por todas as facilidades e apoios concedidos para a realização deste projecto.

PREÂMBULO

O ruído é o som indesejado. E o silêncio absoluto não existe.

Há muito que o Homem procura um equilíbrio entre os dois que lhe permita viver em harmonia.

A história da Medicina mostra-nos que desde muito cedo se associaram algumas doenças a fatores decorrentes das alterações ambientais no meio físico em que o Homem vivia.

Há 400 a.C., na obra “Ares, água e lugares”, Hipócrates já atribuía aos desequilíbrios ambientais, como o ruído, a causa de algumas doenças (Fernandes, 2003).

O ruído começou por ser encarado como um agente perturbador e incomodativo, motivo pelo qual, na antiga Roma, não era permitida a circulação dos vagões durante a noite.

A comunidade científica valorizou os inegáveis efeitos do ruído sobre o aparelho auditivo desde sempre. Os primeiros relatos de surdez associada ao ruído foram dos habitantes que viviam próximo das cataratas do rio Nilo, no Egito, com Hipócrates e Plínio, o Velho, a estabelecerem uma relação causal entre ruído e a perda da audição.

O acentuado crescimento da população e o desenvolvimento industrial têm causado sérios danos ambientais, como a poluição sonora.

A poluição sonora tem sido associada a reacções generalizadas de *stress* (WHO, 2009, 2010, 2011).

A correta caracterização dos ambientes sonoros mostra que o espectro de frequências e a intensidade dos sons a que estamos sujeitos é mais ampla do que o espectro dos sons audíveis.

Pelo que, nos nossos dias, os efeitos do ruído começaram a ser valorizados e estudados de forma mais abrangente conduzindo ao reconhecimento de que a exposição ao ruído é um problema de saúde pública.

Os estudos mostram que o ruído também tem efeitos sistémicos sobre vários órgãos e sistemas, os denominados efeitos extra-auditivos do ruído.

Os trabalhos do nosso grupo já evidenciaram alterações provocadas pelo Ruído de Baixa Frequência (RBF) no sistema vascular, em artérias (Martins dos Santos *et al.*, 2002) e

linfáticos (Martins dos Santos *et al.*, 2004), no sistema urinário (Martins dos Santos *et al.*, 2005), no sistema cardiovascular (Antunes *et al.*, 2013a, 2013b, 2013c, 2013d), no sistema digestivo, estômago (da Fonseca *et al.*, 2006a) e duodeno (da Fonseca *et al.*, 2006b).

O nosso grupo também tem estudado os efeitos do RBF sobre o sistema estomatognático e alterações morfológicas e funcionais na glândula parótida foram observadas (Oliveira *et al.*, 2007, 2013). Também no periodonto existem efeitos provocados pelo RBF, concretamente, alterações no ligamento periodontal, nos estudos de Mendes *et al.*, (2007, 2010, 2014) foram observadas lesões similares às lesões de periodontite.

Pelas alterações reportadas nos trabalhos do nosso grupo que se dedica há mais de 10 anos a este estudo, fica claro que o sistema estomatognático também é afectado pelos efeitos da exposição prolongada ao ruído. Deste sistema dinâmico fazem parte os dentes e, como Médicos Dentistas, sabemos que os dentes podem reflectir um conjunto de desequilíbrios que afectam as outras estruturas da cavidade oral.

Por outro lado, os dentes são preservados durante mais tempo acompanhando o aumento da esperança média de vida das pessoas e beneficiando dos significativos avanços das técnicas e dos materiais dentários, aliados às competências e conhecimentos científicos dos Médicos Dentistas.

Desta forma, baseados em estudos anteriores do nosso grupo, pensamos ter todo o interesse continuar a estudar os efeitos da exposição ao ruído sobre os órgãos da cavidade oral, em particular os dentes.

I - INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

“E a paz é o outro nome do silêncio”

Buda

RUÍDO AMBIENTAL E SAÚDE

O ruído é um importante problema ambiental, especialmente nas áreas urbanas, afetando um crescente número de pessoas (Oud, 2012).

As preocupações com o ruído são muito antigas, e a procura do silêncio já era desejada na Índia muito antes do século IV a.C. fazendo parte das disciplinas seguidas por ascetas e eremitas, que viviam isolados ou em mosteiros.

O ruído é hoje reconhecido como um poluidor, pelo que as preocupações com o impacto do ruído ambiental têm assumido uma relevância crescente; de tal modo que a Organização Mundial de Saúde tenta já quantificar o peso que o ruído ambiental tem na doença (WHO, 2011). No relatório da comissão europeia (COM, 2011) relativo à aplicação da Directiva do Ruído Ambiente, pode ler-se que “A poluição sonora pode incomodar, perturbar o sono, afectar a função cognitiva nas crianças em idade escolar, originar reacções de *stress* fisiológico e causar problemas cardiovasculares em pessoas expostas cronicamente ao ruído (Babisch, 2006; Miedema e Vos, 2007; Babisch, 2008; WHO Europe 2009, 2010) ”.

De acordo com os resultados preliminares do European Burden of Disease (EBoDE) no projecto europeu, relatados na Conferência Ministerial da WHO realizada em Parma em Março de 2010, o ruído do tráfego ficou em segundo lugar entre os agentes causadores de *stress* ambientais, seleccionados e avaliados em termos de impacto na saúde pública, em seis países europeus. Além disso, a tendência é a de que a exposição ao ruído vá aumentando na Europa em comparação com outros fatores de poluição (por exemplo, exposição a fumos, dioxinas e benzeno), que estão em declínio (WHO, 2010).

Os transportes, a indústria e algumas atividades de lazer são exemplos de como os imperativos da vida moderna sujeitam diariamente o indivíduo a níveis excessivos de ruído ou poluição sonora (Paes Cardoso *et al.*, 2006). As consequências lesivas que esta agressão acústica provoca sobre vários sistemas e órgãos, para além do sistema auditivo, são hoje um problema de saúde pública (Carnicelli, 1994; Paes Cardoso *et al.*, 2006; Mahendra Prashanth e Venugopalachar, 2011).

Durante muito tempo, a maioria das avaliações do ruído ambiental baseou-se no incômodo que provocava aos seres humanos, ou na medida em que perturbava diferentes actividades humanas, mas hoje é imperativo olhar para o ruído de forma mais abrangente.

SOM E RUÍDO, RUÍDO INDUSTRIAL, RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA (RBF)

Som e ruído são fenómenos equivalentes (Halliday e Resnick, 1991).

O ruído é considerado todo o som passível de produzir sensações auditivas desagradáveis e incomodativas. Desta forma, não é apenas um fenómeno físico.

Em termos físicos, o ruído corresponde a uma onda acústica que é uma perturbação oscilante de alguma grandeza física no espaço e periódica no tempo (Oud, 2012).

A oscilação espacial é caracterizada pelo comprimento de onda e o tempo decorrido para uma oscilação é medido pelo período da onda, que é o inverso da sua frequência. Estas duas grandezas estão relacionadas com a velocidade de propagação da onda (Steffens *et al.*, 2008).

Fisicamente, uma onda é um pulso energético que se propaga através do espaço ou através de um meio (líquido, sólido ou gasoso).

O meio material influencia a velocidade de propagação do som (Bruel e Kjaer, 2000). De um modo geral, o som propaga-se melhor nos sólidos do que nos líquidos, e propaga-se melhor nos líquidos do que nos gases (Miguel, 1992; Douhéret *et al.*, 2004).

As ondas sonoras são ondas mecânicas do tipo longitudinal e caracterizam-se pelo comprimento de onda, amplitude, frequência, período e velocidade de propagação (Halliday e Resnick, 1991).

A propagação do som em qualquer meio, como no ar, perde intensidade; é a chamada atenuação do som. A atenuação aumenta de forma proporcional ao quadrado da frequência do som. Os ruídos com grandes comprimentos de onda sofrem fraca atenuação.

O ruído industrial é caracterizado por uma elevada intensidade e um amplo espectro de comprimentos de onda.

Um grande número de evidências tem colocado o ruído como um dos riscos ocupacionais mais comuns do mundo moderno (Berglund e Lindvall, 1995). Vários estudos têm

relacionado a exposição crónica ao ruído industrial com o aumento do *stress* individual (Broner, 1978; Backteman *et al.*, 1984; Berglund *et al.*, 1996; Leventhall, 2004; Fouladi *et al.*, 2012).

Recentemente, a diretiva comunitária relativa ao ruído ambiental, European Burden of Disease (EBoDE), acrescentou a este conceito as indústrias como fontes de ruído ambiental (WHO-JRC, 2011).

Segundo a Directiva 2002/49/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Junho de 2002, relativa à avaliação e gestão do ruído ambiente, este define-se como “um som externo indesejado ou prejudicial, criado por actividades humanas, incluindo o ruído emitido por meios de transporte, tráfego rodoviário, ferroviário, aéreo e equipamentos utilizados na actividade industrial”.

O som produzido por um equipamento industrial tem, normalmente, duas vias de propagação, o ar e as estruturas sólidas.

A ressonância altera a distribuição do som e ocorre em espaços fechados, ou parcialmente fechados. O comportamento físico das baixas frequências faz com que estas, muitas vezes se associem a vibrações através de fenómenos de ressonância. Para o corpo humano estas vibrações são diferentes das transmitidas diretamente através do contacto com uma fonte vibrátil, por exemplo, através dos membros. No caso das vibrações originadas por ruído de baixa frequência através de fenómenos de ressonância, a estimulação é aplicada sobre toda a superfície corporal (“*whole body exposure*”) e frequentemente referida pelos indivíduos como sendo mais intensa no tórax e na cabeça (Mohr *et al.*, 1965; Slarve e Johnson, 1975).

Isso causa tanto o *stress* psicológico como a vibração física das estruturas do corpo. Este último efeito é resultante do impacto das ondas sonoras de baixa frequência na superfície do corpo.

O ouvido humano detecta frequências no intervalo compreendido entre os 20Hz e os 20000Hz (Miguel, 1992; Martin *et al.*, 1997; Oud, 2012) (figura 1).

Consideramos como infrassons frequências abaixo dos 20Hz.

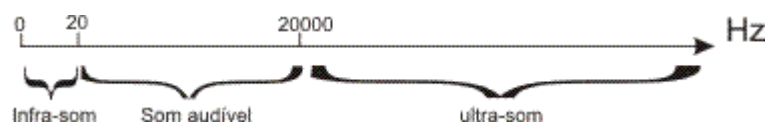


Figura 1 - Espectro do som. O intervalo compreendido entre os 20 e os 20000Hz corresponde ao som audível. Valores abaixo dos 20 Hz denominam-se de infra-sons e os valores acima dos 20000 Hz chamam-se ultra-sons.

O ruído de baixa frequência (RBF) corresponde a um espectro de frequências dos 10Hz aos 200Hz para alguns autores e, para outros autores o espectro é considerado dos 10 Hz aos 500Hz (Takahashi *et al.*, 2005; Oud, 2012). Em Portugal, o espectro considerado vai desde os 10Hz aos 500Hz, incluindo o som audível e os infrassons.

AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RUÍDO

A maioria dos equipamentos utilizados para a avaliação do ruído ambiental incorporam filtros de ponderação, que procuram mimetizar o ouvido humano.

Na legislação internacional relativa ao ruído, um dos filtros mais utilizados como parâmetro padrão de medição é o “*A weighting filter*”, que apresenta os resultados em dB (A) ou dBA.

O uso de medições com o filtro dBA parte do pressuposto de que as lesões provocadas pelo ruído se limitam ao aparelho auditivo e se devem unicamente às altas intensidades, numa determinada análise de distribuição de frequências. Tanto assim é que estas medições se destinam a avaliar se determinado ruído ultrapassa o limiar de reversibilidade de efeitos para o órgão de Corti, baseando-se no facto de níveis elevados de ruído poderem levar à surdez. Se consultarmos as Normas de Higiene Ocupacional (NHO 01, 2001) no nosso país, para a avaliação da exposição ocupacional ao ruído, verificamos quão limitativos são os objetivos das normas técnicas que passamos a citar: “As normas têm por objetivo estabelecer critérios e procedimentos para a avaliação da exposição ocupacional ao ruído, que implique risco potencial de surdez ocupacional”. A atuação das entidades que avaliam a exposição ocupacional ao ruído faz-se somente a partir do valor do “nível de ação”, que por definição é “O valor acima do qual devem ser iniciadas ações preventivas de forma a minimizar a probabilidade de que as exposições ao ruído causem prejuízos à audição do trabalhador e evitar que o limite de exposição seja ultrapassado” (NHO 01, 2001).

No entanto, o ouvido humano não responde de igual modo a todas as frequências, é mais sensível para frequências entre os 1000Hz e os 4000Hz, e há efeitos extra-auditivos que devem ser considerados.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a medição sem filtros porque, como hoje percebemos, a medição em dBA é insuficiente e pouco exacta para as baixas frequências (Hellman e Zwicker, 1987; Berglund *et al.*, 1999), porque ao filtro “A-weighting” corresponde uma curva de atenuação que cai rapidamente nas frequências inferiores a 500Hz desvalorizando assim a intensidade do som nesta faixa. No ruído ambiental existem inúmeras fontes de RBF; este facto levou a que as recomendações para a exposição e medição do ruído não se considerassem só em função dos efeitos auditivos, em dBA, mas com outros filtros mais sensíveis às baixas frequências que existem no ruído ambiental (Ising *et al.*, 2004). O desejável, para a avaliação das baixas frequências, seria uma medição não ponderada que traduzisse a variação real da pressão sonora (Db.SPL – Sound Pressure Level), ao longo do tempo e que incluísse o ruído de baixa frequência e os infrasons. O “linear weighting” também designado por Z-Weighting, exprime-se em dBL e mantém uma atenuação igual entre os 10 e os 20000 Hz, sem valorizar ou desvalorizar quaisquer frequências.

A figura 2 compara a distribuição espectral acústica obtida no “cockpit” de um Airbus-A340, à velocidade de cruzeiro, com as distribuições espectrais obtidas dentro de um comboio suburbano; como pode ser observado, os valores dBA são os mesmos, enquanto os valores dBLin diferem em 12 dB. O valor em dBA representa o que o ser humano pode *ouvir* enquanto o valor dBLin indica a quantidade de energia acústica presente no ambiente. Assim, tanto na cabine de pilotagem como no comboio, o que será *ouvido* será o mesmo, mas o indivíduo no comboio está exposto a uma maior quantidade de energia acústica.

Como se disse, o valor em dBA mede a amplitude média da energia acústica que está a ser captada (percebida) pelo sistema auditivo humano e a sua utilidade prende-se com a prevenção da surdez. O valor dBLin mede a amplitude global da energia acústica presente no ambiente, ou seja, mede a amplitude do que está realmente presente e não apenas o que está a ser ouvido. Até porque na verdade, o ruído de baixa frequência está presente em todos os ambientes, inclusive naqueles que, comumente se consideram “silenciosos” porque a fonte do ruído pode estar tão distante que não permite a sua identificação.

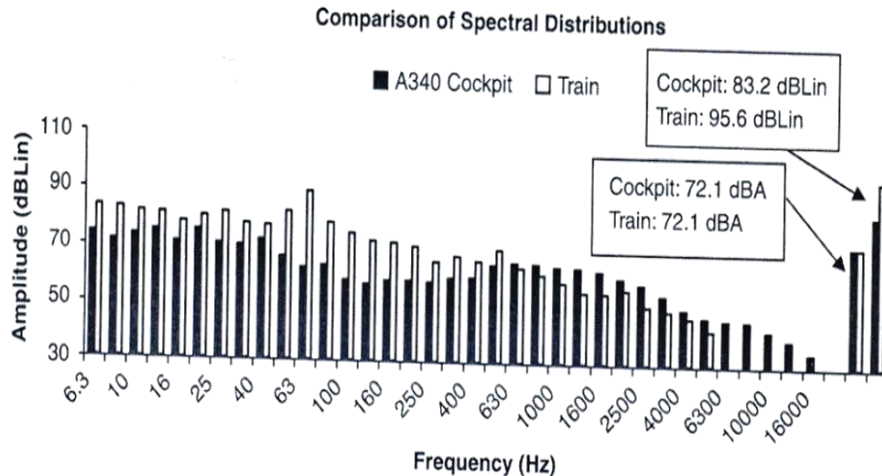


Figura 2 - Distribuição espectral em 1/3 de oitava, sem ponderação A (dB-Linear), obtidos em (a) “cockpit” do Airbus-A340 (Alves-Pereira et al., 2001), em velocidade de cruzeiro, e (b) num comboio suburbano de Lisboa, em movimento, na posição de passageiros (Alves-Pereira et al., 2004b). As duas barras à direita comparam os valores globais (Leq), tanto em dBA e dBLin, ou seja, com e sem ponderação A, respectivamente. Como pode ser observado, os valores dBA são os mesmos, enquanto os valores dBLin diferem em 12 dB. O valor em dBA representa o que o ser humano pode *ouvir* enquanto o valor dBLin indica a quantidade de energia acústica presente no ambiente. Assim, tanto na cabine de pilotagem como no comboio, o que será *ouvido* será o mesmo, mas o indivíduo no comboio está exposto a uma maior quantidade de energia acústica.

Com o aumento dos conhecimentos e informações sobre a temática do ruído, tornou-se inevitável o estudo dos efeitos extra auditivos do ruído industrial/RBF.

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO RBF/RUÍDO INDUSTRIAL

Durante os anos 90, o grupo de Nuno Grande do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, realizou um conjunto de estudos onde foi observada fibrose na traqueia, pulmões e pleura, alterações dos cílios da traqueia e brônquios (Grande *et al.*, 1999; Sousa Pereira *et al.*, 1999a, 1999b). Nestes estudos experimentais foi possível induzir derrames pleurais por incompetência morfofuncional das microvilosidades pleurais (Sousa Pereira *et al.*, 1999b) e por incapacidade fagocítica ao nível da pleura (Oliveira *et al.*, 1999). Os estudos em modelo animal comprovaram que a exposição ao RBF acelera a manifestação de doenças auto-imunes “lúpus-like” (Águas *et al.*, 1999b), e também conduz a diminuição significativa de linfócitos CD4+ e CD8+ em animais expostos a RBF de alta intensidade (Águas *et al.*, 1999a).

Os estudos mais recentes de Oliveira *et al.*, (2012) revelaram um aumento significativo do tecido conjuntivo na região centrolobular do fígado dos ratos expostos ao ruído industrial. Os autores atribuíram essa transformação fibrótica ao efeito sistêmico da exposição crônica ao ruído industrial, tanto em roedores como em humanos.

Os estudos do nosso grupo no CiiEM, Centro de Investigação Interdisciplinar do Instituto Superior de Ciências da Saúde – Egas Moniz, revelaram alterações nas artérias do rato Wistar exposto ao RBF (Martins dos Santos *et al.*, 2002), nomeadamente o espessamento da íntima das artérias, acompanhado de rutura da lâmina elástica interna. Os mesmos investigadores (Martins dos Santos *et al.*, 2004) mostraram que estas alterações se repercutem também nos vasos linfáticos, que se encontram dilatados, com paredes espessadas e rutura valvular. Martins dos Santos *et al.*, (2005) observaram, também em modelo animal do rato Wistar exposto ao RBF, tumefação do glomérulo renal e degeneração de podócitos. da Fonseca *et al.*, (2005; 2006) encontraram no epitélio do estômago e duodeno lesão e morte celular com consequentes erosões, fibrose e espessamento da submucosa e indícios de hemangiogénese. Os estudos recentes de Antunes *et al.*, (2013b) provaram existir uma significativa fibrose no miocárdio nos ratos expostos ao RBF e uma redução das conexinas que participam na coordenação da contração do músculo cardíaco (Antunes *et al.*, 2013d).

A exposição crônica dos trabalhadores da indústria têxtil ao ruído é conhecida por aumentar a excreção de cortisol urinário (Melamed e Bruhis, 1996; Sudo *et al.*, 1996). Androgénios adrenais, tais como sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS), que é produzido pela zona fasciculada da glândula adrenal, também tem sido associado ao *stress* agudo provocado pelo ruído em seres humanos (Testa *et al.*, 1994). Estímulos de *stress* são capazes de ativar a libertação de hormonas que são independentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), como a prolactina, a qual se demonstrou capaz de induzir hipertrofia da zona fasciculada da adrenal (Robba *et al.*, 1985). No conjunto, as alterações morfológicas observadas na zona interior do córtex adrenal sugerem que há uma ativação do eixo HHA pelo *stress* (Oliveira *et al.*, 2009). Após a exposição crônica dos ratos ao ruído industrial, comprovaram-se alterações citológicas nas glândulas adrenais e os estudos sugerem a existência de uma resposta sustentada ao *stress* (Oliveira *et al.*, 2009).

Os níveis de cortisol na saliva também têm sido usados como parâmetro de medição na avaliação do *stress*. Em condições normais, a produção de cortisol tem um ritmo circadiano (Dorn *et al.*, 2007) atingindo os valores mais altos no início da manhã e caindo para valores mais baixos durante a noite. Os estudos de Fouladi *et al.*, (2012) realizados

em 80 trabalhadores expostos ao ruído industrial, com intensidades acima dos 80 dBA, revelaram um aumento significativo dos níveis de cortisol na saliva no período da noite, em dias de trabalho, em comparação com as concentrações mais baixas de cortisol, no mesmo período, em dias de lazer.

Investigadores do nosso grupo também estudaram as glândulas parótidas onde foi observada degenerescência vacuolar, necrose e morte celular, fibrose do tecido conjuntivo e espessamento da parede dos pequenos vasos (Oliveira *et al.*, 2005; 2007; 2013), tanto em modelo animal como no humano. Os mesmos autores relataram alterações qualitativas e quantitativas da saliva após prolongada exposição ao RBF.

Os estudos de Mendes *et al.* (2007; 2010; 2014) provaram que também o periodonto é afetado pela exposição ao RBF, tendo sido observadas lesões semelhantes à doença periodontal, com um aumento da atividade osteoclástica sobre o osso periodontal, alterações nas paredes dos vasos periodontais, proliferação das matrizes extracelulares e fibrose do ligamento.

O DENTE

Os dentes são órgãos “brancos”, de consistência dura, implantados nos bordos alveolares das maxilas e da mandíbula.

A mastigação é a sua principal função, mas também têm um papel importante na fonação e contribuem para a estética da boca e da face (Rouvière e Delmas, 2005).

Cada dente apresenta uma porção intra-alveolar, a raiz, uma porção coronária ou coroa e o colo dentário a unir a raiz à coroa (Berkovitz *et al.*, 2004).

No processo de mastigação, à morfologia das coroas dentárias são atribuídas funções específicas. Os incisivos, cuja coroa tem a forma de bisel, têm a função de corte dos alimentos; os caninos, com coroa em forma de cone, têm a função de rasgar os alimentos; os molares, apresentam a coroa prismática e a principal função é a de triturar os alimentos (Berkovitz *et al.*, 2004). As saliências que as coroas dos dentes apresentam na face oclusal (ou de mastigação) denominam-se de cúspides (Williams *et al.*, 1995).

Na espécie humana, a dentição decídua compreende 20 dentes. Cada hemiarcada tem 2 incisivos, 1 canino e 2 molares. A dentição permanente é constituída por 32 dentes. Em cada hemiarcada existem 2 incisivos, 1 canino, 2 pré-molares e 3 molares (Avery e Chiego, 2006).

Os dentes podem ter apenas uma raiz, monorradiculares, como é o caso dos incisivos e dos caninos ou podem ser multirradiculares, como os pré-molares e os molares (Bhaskar, 1991).

No interior de cada dente, encontra-se a polpa dentária, rica em tecido conjuntivo, vasos e nervos; a proteger e delimitar a polpa, existem os tecidos duros do dente – a dentina, revestida pelo esmalte na parte coronária e pelo cemento na porção radicular. O ligamento periodontal e o osso alveolar fazem parte do conjunto de tecidos que suportam e protegem o dente (Bhaskar, 1991).

Pode dizer-se que o desenvolvimento dos dentes envolve uma sequência de interações recíprocas entre o epitélio dentário e as células mesenquimatosas (Linde e Goldberg, 1993; Cobourne e Sharpe, 2003). A sequência de acontecimentos ocorre através de uma série de cito-diferenciações em padrões espaço temporais específicos (Linde e Goldberg, 1993) (figura 3) de que não falaremos exaustivamente, mas de que destacamos os seguintes aspetos:

Na formação do dente consideramos a seguinte sequência: fase de botão, fase de chapéu, fase de sino, dentinogénese e amelogénese (figura 3). É na fase de sino que as células do epitélio externo adquirem progressivamente um aspeto pavimentoso, enquanto a região central continua a expandir-se. É também nesta fase que se inicia a formação do esmalte e da dentina.

No epitélio interno, as células de morfologia prismática diferenciam-se em ameloblastos, células responsáveis pela formação e mineralização da matriz do esmalte. Estas células adquirem características de células secretoras de proteínas e depois permanecem inativas até os odontoblastos produzirem a 1ª camada de matriz dentinária.

O mecanismo de sinalização celular que ocorre permite que as células interajam através de um sistema de efetores, moderadores e recetores (Veis, 2003).

É de realçar o papel dos pré-ameloblastos porque induzem os odontoblastos da papila dentária a secretarem a matriz dentinária (dentinogénese).

A presença de matriz de dentina vai desencadear a diferenciação final dos ameloblastos, que desenvolvem no polo apical uma curta projeção cónica – o prolongamento de Tomes, marcando o início de formação do esmalte (amelogénese).

Os odontoblastos segregam as proteínas para o exterior da célula através das vesículas na porção apical e através dos prolongamentos celulares. A matriz dentinária de colagénio é depositada por incrementos, como no osso e no esmalte, indicando o ritmo

de formação diário dos tecidos duros. O local de formação inicial é no topo das cúspides, e à medida que mais camadas são formadas (depositadas), mais odontoblastos são ativados ao longo da junção amelo-dentinária (Avery e Chiego, 2006). Como os prolongamentos odontoblásticos se alongam, os túbulos dentinários vão-se formando e a matriz é depositada à volta do túbulo.

A dentinogénese ocorre em duas fases: primeiro forma-se a matriz de colagénio, seguida da deposição de cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatite) na matriz. A mineralização inicia-se com o aparecimento de pequenos cristais à superfície das vesículas e das fibras de colagénio. Os cristais crescem, espalham-se e coalescem até que a matriz fique completamente mineralizada, deixando apenas por mineralizar a recém-formada banda de matriz dentinária que circunda a polpa (a pré-dentina) (Avery e Chiego, 2006).

Assiste-se assim a um crescimento centrípeto da dentina (em direção à polpa) e a um crescimento centrífugo do esmalte (em direção ao epitélio oral).

Uma vez completada a forma da coroa e iniciado o processo de histogénese dentária, começa a formação e desenvolvimento da raiz, bem como o desenvolvimento dos tecidos que compõem o periodonto de inserção, a partir da bainha radicular de Hertwig resultante da união entre o epitélio dentário externo e o epitélio dentário interno.

A formação da raiz e a cementogénese continua até o dente se tornar funcional, i.e., erupcionar, e as suas estruturas de suporte se encontrarem totalmente desenvolvidas (Avery e Chiego, 2006) (figura 3).

A morfologia e o número de dentes acompanham as necessidades de cada espécie animal (Ohazama *et al.*, 2010). Uma vez que o nosso estudo foi realizado em modelo animal (rato Wistar), assinalamos adiante as particularidades da dentição dos roedores.

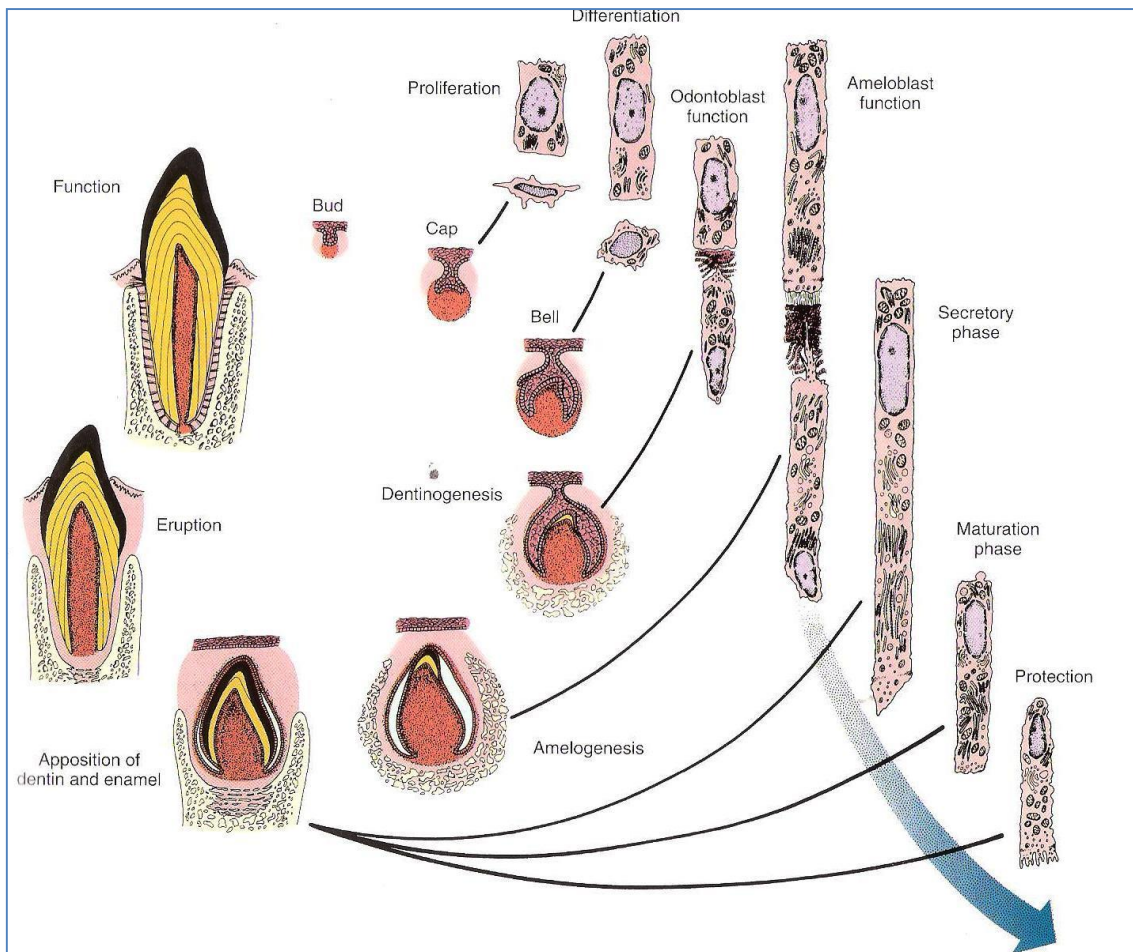


Figura 3 – Esquema representativo do processo de formação e desenvolvimento do dente (odontogênese). À esquerda observamos as fases de botão (bud), de chapéu (cap) e de sino (bell), o período da dentinogênese e de amelogênese, até à formação completa do dente erupcionado e em função. À direita estão representadas as alterações morfológicas celulares correspondentes a cada período da embriologia do dente. Adaptado de Avery e Chiego, 2006.

ESMALTE

O esmalte dentário reveste a coroa do dente e é considerado o tecido mais duro do organismo (Bhaskar, 1991). O esmalte confere forma e contorno à coroa do dente, recobrando a porção exposta do dente na cavidade oral (Avery e Chiego, 2006).

Tem um índice de dureza de 343 na escala de Knoop (Knoop Hardness Number) (Summitt *et al.*, 2006). Na escala de minerais de Mohs, o esmalte equivale ao índice 5, dureza correspondente à da apatite. A densidade do esmalte é de 2,8 (Bhaskar, 1991).

A cor do esmalte varia do branco-acinzentado ao branco-amarelado e é fortemente influenciada pela cor da dentina, devido à sua translucidez.

A espessura do esmalte é variável, mas nas cúspides dos molares e dos pré-molares pode chegar aos 2,5mm (Bhaskar, 1991) e aos 2,0mm nos bordos incisais dos dentes, assumindo valores significativamente menores nas zonas das fissuras oclusais e região cervical do dente (Summit *et al.*, 2006).

Apesar de duro, pelo seu alto conteúdo inorgânico, o esmalte é um tecido extremamente frável e quebradiço. Por esse motivo, a dentina confere sustentação e reduz a possibilidade de fratura durante a mastigação (Katchburian e Arana, 2004).

O esmalte é constituído por 96% de matéria inorgânica sob a forma de cristais de hidroxiapatite (fosfato de cálcio), 1% de matéria orgânica e 3% de água (Bhaskar, 1991).

A enamelina é o principal componente orgânico do esmalte.

Os prismas de esmalte são a unidade básica estrutural desta camada (figura 4). Estima-se que o número de prismas que constituem o esmalte de cada dente seja de 5 a 12 milhões. Os prismas são estruturas longitudinais com aproximadamente 4 µm. A orientação dos prismas é sinuosa. Por norma, orientam-se em ângulo reto em relação à dentina subjacente ou à superfície do dente. Junto à união amelo-cementária os prismas têm uma direção mais horizontal. A mudança de direção dos prismas reflete-se na existência das bandas de Hunter-Schreger (Bhaskar, 1991). O diâmetro dos prismas aumenta à medida que se aproximam da superfície.

As linhas incrementais do esmalte (ou linhas de Retzius) são o resultado da rítmica deposição do esmalte.

Na maioria dos dentes decíduos, parte do esmalte é formado antes do nascimento e outra parte após o nascimento (Bhaskar, 1991; Avery e Chiego, 2006). Devido às mudanças abruptas de ambiente e de nutrição na altura do nascimento, forma-se uma notória linha no esmalte neste período, a linha neonatal (Bhaskar, 1991).

Durante a amelogénese alguns distúrbios sistémicos nas crianças podem afectar a formação do esmalte, e isso pode resultar em períodos de repouso mais prolongados e, consequentemente, em estrias (ou linhas) de Retzius mais evidentes. Deste modo, a linha neonatal constitui uma linha de Retzius acentuada (Katchburian e Arana, 2004).

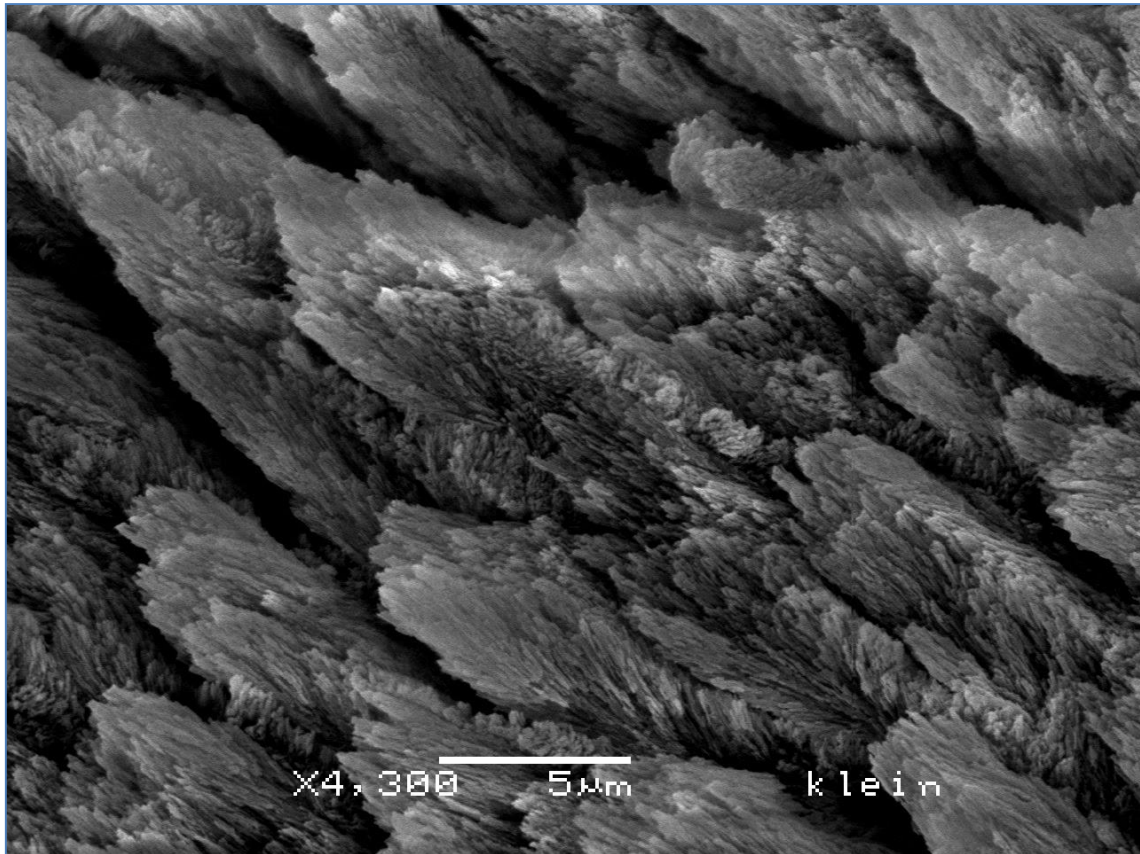


Figura 4 – Imagem de SEM com os prismas de esmalte. Adaptado de <http://dentisticaulbra.blogspot.pt/>

Os dentes decíduos apresentam a camada de esmalte mais fina do que os dentes permanentes (Grine, 2005).

A cor mais branca dos dentes decíduos em comparação com os dentes permanentes deve-se à menor translucidez do esmalte. Nos dentes permanentes, devido à maturação pós-eruptiva, à medida que aumenta o tempo de exposição na cavidade oral, aumenta também a translucidez do esmalte, deixando transparecer mais a cor da dentina subjacente (Katchburian e Arana, 2004).

A composição do esmalte superficial pode sofrer alterações pela adição ou trocas com os fluídos orais (Berkovitz *et al.*, 2004). O flúor pode ser benéficamente incorporado à superfície do esmalte, reduzindo a sua porosidade e a susceptibilidade à cárie.

DENTINA

A dentina é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo recoberta pelo esmalte na porção coronária e pelo cimento, na porção radicular. A dentina aloja no seu interior tecido conjuntivo não mineralizado, a polpa dentária (Katchburian e Arana, 2004).

Física e quimicamente, a dentina é muito semelhante ao osso (Bhaskar, 1991).

Propriedades Físicas da Dentina

A dentina apresenta cor branco-amarelada e contribui para a tonalidade do dente devido à translucência do esmalte.

Apresenta um índice de dureza na ordem dos 68 na escala de Knoop (Knoop Hardness Number).

A arquitetura tubular e a matriz orgânica fazem com que a dentina tenha uma capacidade de resistência à tensão e à compressão maior do que a do esmalte (Berkovitz *et al.*, 2004), por isso é mais resiliente.

A dentina é permeável, e essa permeabilidade depende do diâmetro e do número de túbulos dentinários, que decrescem com a idade (Berkovitz *et al.*, 2004).

Propriedades Químicas da Dentina

A dentina é constituída em 70% do seu peso por matéria inorgânica, sob a forma de cristais de hidroxiapatite, cerca de 20% de matéria orgânica e 10% de água (Berkovitz *et al.*, 2004).

De acordo com Summitt *et al.* (2006), 45 a 50% do volume da dentina é ocupado pelos cristais inorgânicos de hidroxiapatite, cerca de 30% corresponde à matriz orgânica e aproximadamente 25% é água.

Os cristais de hidroxiapatite têm forma laminar, são muito mais pequenos do que os cristais do esmalte e estão compostos por vários milhares de unidades moleculares com a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A matriz orgânica da dentina tem dois componentes: o fibrilhar, constituído pelas fibras colagénias e a substância fundamental interfibrilhar (Katchburian e Arana, 2004).

Ao longo do tempo, os constituintes da dentina não suscitaram todos o mesmo interesse e, por exemplo, as proteínas não colagénias eram vistas com pouco interesse biológico.

Os estudos da última década permitiram aumentar o conhecimento das proteínas da matriz e, atualmente, reconhece-se a expressão que estas proteínas têm nos tecidos não mineralizados (Qin *et al.*, 2007).

A matriz orgânica da dentina contém diferentes proteínas extra-celulares, como colagénio tipo I, proteoglicanos, fosfoproteínas da dentina e sialoproteínas (Suppa *et al.*, 2006).

O colagénio presente na dentina é principalmente do tipo I e representa 90% da matriz orgânica (Katchburian e Arana, 2004). O colagénio do tipo V também está presente, mas em proporção muito baixa. Quantidades muito pequenas de colagénio tipo I trimérico e de colagénio tipo III foram também detetadas na maioria das preparações de dentina (Boskey, 1991).

Papel / Função dos componentes da matriz na mineralização da dentina

A formação de hidroxiapatite na dentina e noutros tecidos de base colagénia (cimento, cartilagem calcificada, tendões e osso) ocorre mediante processos “cell-mediated”. As células produzem a matriz extracelular enquanto o mineral é depositado, regulando o fluxo de iões de cálcio e fosfato para a matriz e produzindo as enzimas e os fatores de crescimento que regulam tanto a função, como a composição da matriz (Boskey, 1991).

As fosfoproteínas representam as principais proteínas não-colagénias (Berkovitz *et al.*, 2004), correspondendo a cerca de 50% da matriz orgânica não colagénia da dentina (Hart e Hart, 2007).

A fosfoforina ou PP-H é a mais abundante das proteínas não colagénias da dentina. Há indicadores de que a fosfoforina está envolvida tanto na deposição mineral inicial como na regulação do tamanho e orientação dos cristais mineralizados de dentina (Boskey, 1991). Sabe-se há muito (Lee *et al.*, 1977; Zanetti *et al.*, 1981) que a fosfoforina é altamente aniónica e tem a capacidade de se ligar ao cálcio.

A osteocalcina (Gla proteína óssea – ácido gamacarboxiglutâmico) está presente em abundância em algumas dentinas, mas não em todas, i.e., tem sido encontrada na dentina do rato, mas não na dentina bovina (Linde, 1984; Bronckers *et al.*, 1985). Foi também encontrada nas *dentin organ cultures* (Dimuzio *et al.*, 1981). A osteocalcina encontra-se na porção mineralizada da dentina do rato e raramente é detetada na pré-dentina. Esta proteína, sintetizada pelos odontoblastos, alcança a matriz dentinária e os estudos demonstraram que a osteocalcina no dente não é derivada da circulação (Bronckers *et al.*, 1990).

As proteínas derivadas do soro, como a albumina, a IgG, a IgM, a IgA e a transferrina, apresentam concentrações no fluído dentinário normal de aproximadamente um quinto (1/5) relativamente ao plasma (Maita *et al.*, 1991), que é de 88,9 µg/ul. Acredita-se que uma das causas da hipersensibilidade dentinária é causada pelos gradientes de pressão devido ao movimento do fluído dentro dos túbulos na presença de comunicações tubulares com os fluidos orais (Brännstrom *et al.*, 1967; Yoshiyama *et al.*, 1989).

As fibras de colagénio unem-se pelos proteoglicanos, que funcionam como pontes entre as fibras contíguas (Scott, 1988). Os proteoglicanos estão orientados perpendicularmente à direção das fibras de colagénio, unindo-se à anterior a cada 68nm (Bourdon *et al.*, 1985). São proteínas de alto peso molecular (11-220 kDa), contendo carboidratos polianiónicos, e são constituídas por um polipéptido central e cadeias laterais de glicosaminoglicanos (Suppa *et al.*, 2006).

As matrizes dos tecidos mineralizados contêm numerosos fatores de crescimento (GF) (Hauschka *et al.*, 1986; Canalis e Lian, 1988) e alguns deles acumulam-se devido à capacidade de se ligarem ao mineral.

Os osteoblastos (Hauschka *et al.*, 1986) e os odontoblastos (Veis *et al.*, 1989) também sintetizam fatores de crescimento que regulam as suas funções e estimulam a sua diferenciação e proliferação. Neste sentido, estes fatores são importantes no processo de mineralização, desde que a atividade celular esteja no centro do processo.

A matriz dentinária também é rica em fatores de crescimento que, quando se atenuam e se difundem para o tecido pulpar, ajudam à defesa do complexo dentino-pulpar (Grando Mattuella *et al.*, 2007). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um potente mitogénio para as células endoteliais, promove a sobrevivência das células endoteliais e a angiogénese. Entre os recetores, o VEGFR-2 parece ser o mais intimamente relacionado com as atividades mitogénicas, migração celular, permeabilidade vascular e sobrevivência das células epiteliais (Grando Mattuella *et al.*, 2007).

Tipos de dentina

Reconhecemos três tipos de dentina: a dentina primária, que constitui a maior parte do dente no contorno da câmara pulpar; a dentina secundária, que se desenvolve depois da formação completa da raiz do dente; e a dentina terciária, também denominada dentina secundária irregular (Ten Cate, 1998).

Dentina Primária

É a dentina formada até ao encerramento do ápice radicular e compreende a dentina do manto e a dentina circumpulpar.

Forma-se a uma média de 4 µm por dia (Schour e Poncher, 1937; Massler e Schour, 1946; Kawasaki e Weiss, 2008), sendo a sua formação menor na raiz do que na coroa do dente.

Com base nas diferenças histológicas e nas propriedades do mineral ou da matriz, distinguimos a dentina do manto (adjacente à junção amelodentinária) e a dentina circumpulpar (restante estrutura de dentina).

A **dentina do manto** é a primeira camada de dentina a ser formada. O processo de formação da dentina do manto começa com a secreção dos principais constituintes da matriz orgânica, sendo as fibras de colagénio os elementos mais numerosos (Arana-Chavez e Massa, 2004; Katchburian e Arana, 2004).

Uma vez formada uma fina camada de matriz orgânica, inicia-se a deposição de mineral no seu interior. Os locais onde os primeiros cristais de hidroxiapatite são observados, sob a forma de finas agulhas, são as vesículas da matriz, as quais, dependendo do número de cristais presentes no seu interior, se tornam irregulares, com contorno frequentemente angular (Katchburian e Arana, 2004). Na primeira etapa da mineralização da dentina do manto não há deposição mineral na restante matriz orgânica, mesmo nas fibras colagénias (Linde, 1984). Posteriormente, após a mineralização da maioria das vesículas, observam-se imagens correspondentes a matriz mineralizada e a partir daqui, não são libertadas novas vesículas da matriz. Estas regiões possuem um centro mineralizado muito denso, com aspeto semelhante ao das vesículas da matriz repletas de cristais. À volta desse centro, a matriz calcificada é menos densa, em geral orientada em torno do longo eixo das fibras colagénias situadas em volta. A continuação do processo de mineralização do componente fibroso da matriz leva à formação de uma estrutura contínua de dentina mineralizada, situada logo abaixo do esmalte que nesta fase, está apenas no início da sua formação (Katchburian e Arana, 2004).

A dentina do manto é produzida pelos odontoblastos em diferenciação, uma vez que, logo após o início da diferenciação, os odontoblastos do manto ou imaturos iniciam a secreção dos constituintes da matriz orgânica da dentina, libertando também as vesículas da matriz. Posteriormente, quando a formação da dentina do manto termina, alcançando uma espessura que varia de 10 a 30µm, os odontoblastos atingem a sua completa diferenciação e polarização, passando a denominar-se odontoblastos circumpulpare ou

maduros; estes continuam a síntese e secreção dos constituintes orgânicos da matriz, a qual, após mineralizar, constitui a **dentina circumpulpar** (Katchburian e Arana, 2004).

Uma vez terminada a formação da dentina do manto, os odontoblastos, enquanto se deslocam centripetamente, continuam a depositar as moléculas da matriz orgânica, sendo ainda as fibras colagénias os elementos mais numerosos. No entanto, estas fibras apresentam um diâmetro máximo de 50 nm e dispõem-se, quase todas, orientadas em torno do longo eixo dos túbulos dentinários (figura 5). Para além do colagénio, os restantes componentes da matriz extracelular são também produzidos, quase exclusivamente, pelos odontoblastos, devido aos complexos juncionais presentes entre as suas membranas plasmáticas distais. Embora essas junções oclusivas sejam do tipo macular ou focal, restringem parcialmente a passagem de substâncias através da via intercelular. Assim, moléculas promotoras da mineralização, secretadas para o interior da matriz, aí permanecem e associam-se às fibras colagénias, possibilitando a sua calcificação na ausência de vesículas de matriz (Katchburian e Arana, 2004).

A dentina do manto está separada da dentina circumpulpar por uma zona de formação irregular de dentina denominada **dentina globular** (figura 6), que se evidencia pelos espaços entre os glóbulos, os espaços interglobulares. Acredita-se que esta dentina resulta de uma deficiente mineralização (Avery e Chiego, 2006).

A dentina globular é o resultado da adesão de calcosferitas de fosfato de cálcio dispersas na dentina circumpulpar que vão formando glóbulos de hidroxiapatite cristalina. Estas calcoesferitas continuam a crescer por aposição, formando grandes glóbulos calcificados. Quando estas esférulas crescem, unem-se entre si para completar a dentina intertubular da dentina circumpulpar (Davis, 1988).

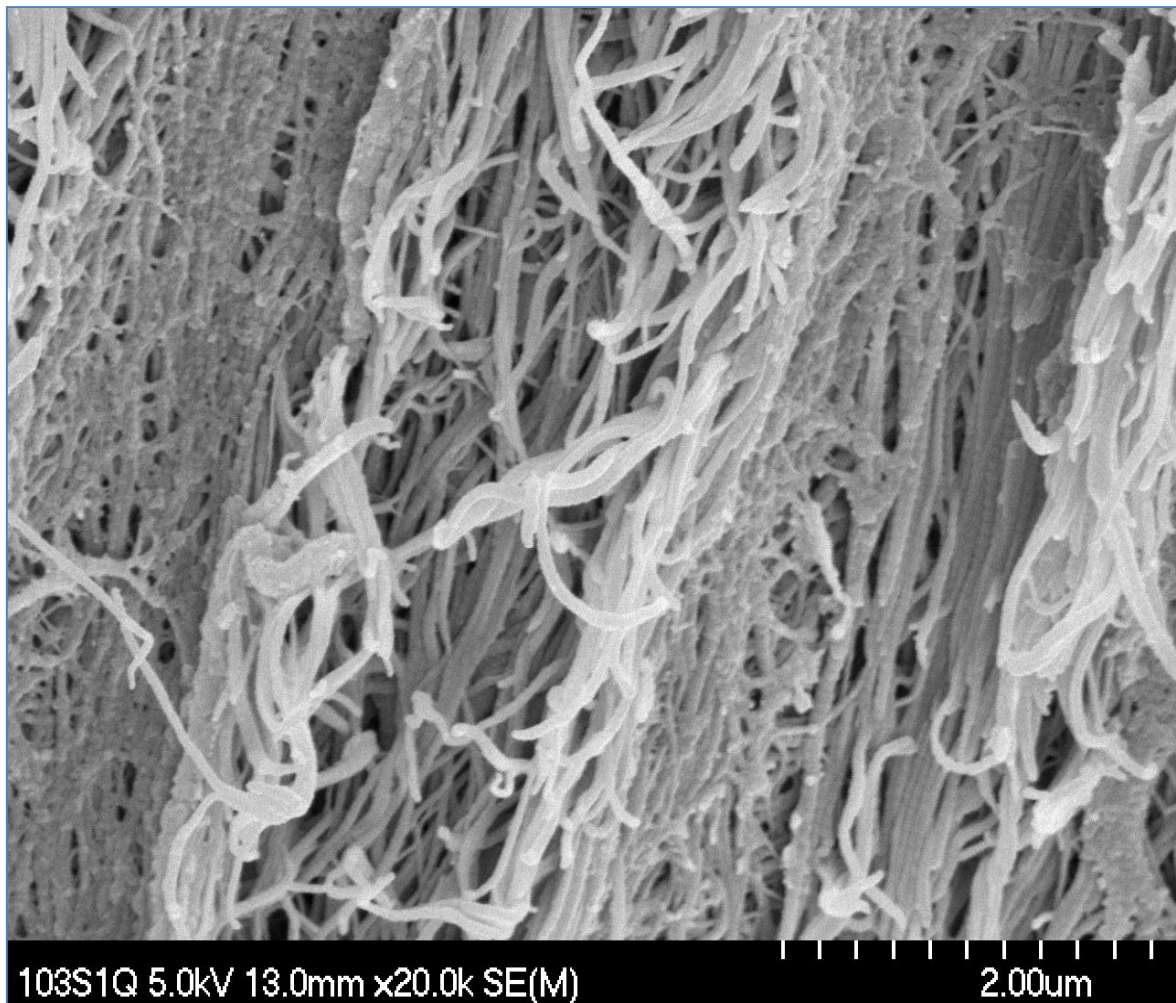


Figura 5 – Imagem de FESEM mostrando a disposição das fibras de colagénio em torno dos túbulos dentinários.

Curiosamente, as linhas circadianas de mineralização da dentina distinguem-se pelo seu aspeto de calcoesferitas (pequenas esferas de dentina mineralizada) aumentando de tamanho à medida que se juntam umas com as outras (Dean, 2006). São estes incrementos mineralizados de dentina que estão bem preservados e visíveis nos fósseis (Boyde e Riggs, 1990).

A **dentina interglobular** (figura 6) é a que se localiza nas porções externas da dentina circumpulpar, próxima da dentina do manto. São regiões de matriz de colagénio não calcificada situadas entre os glóbulos das calcoesferitas globulares da dentina circumpulpar (Davis, 1988).

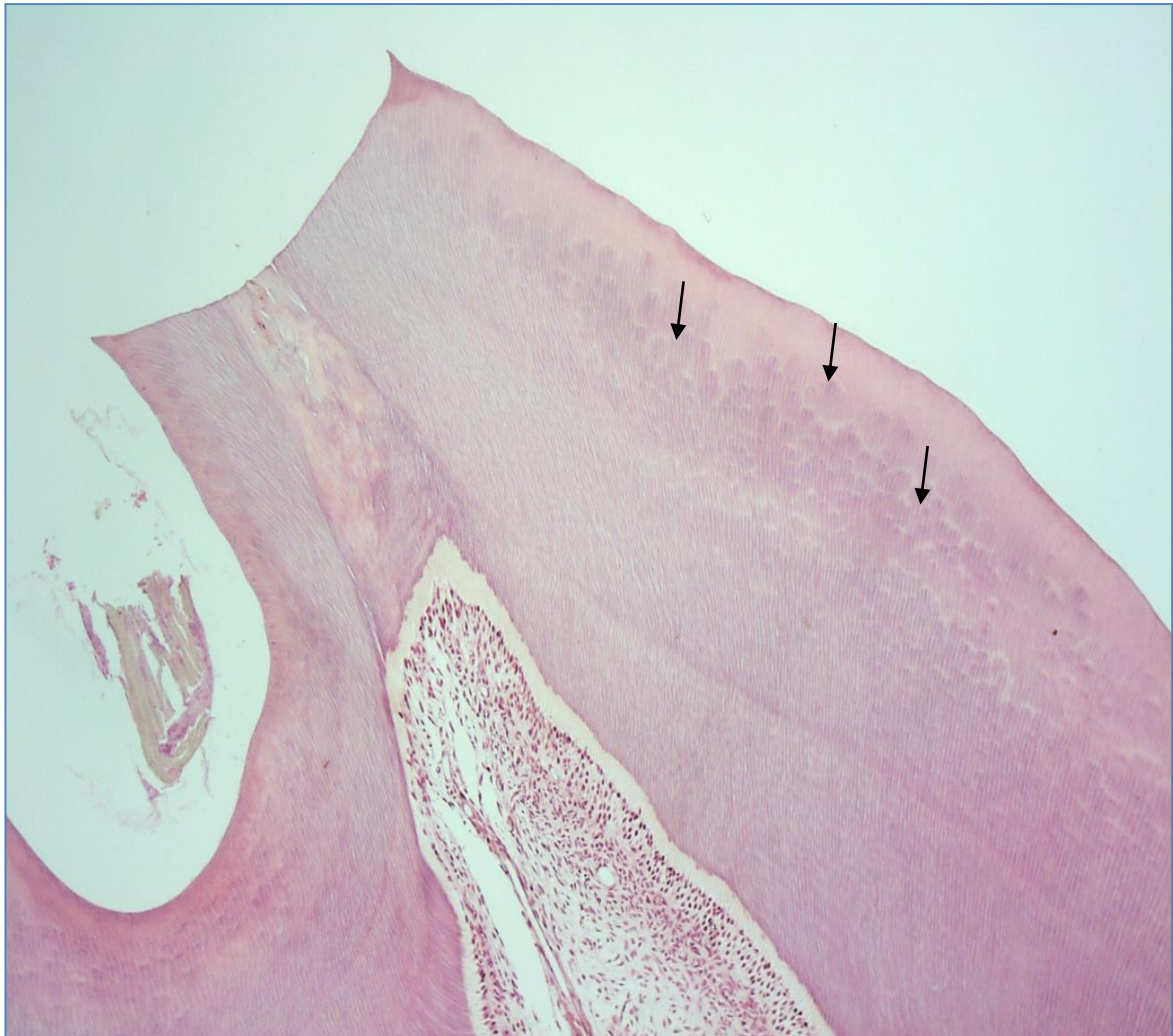


Figura 6 – Dentina globular e interglobular (setas). Molar do rato Wistar. HE,40x.

Como a formação ocorre por aposição centrípeta, a dentina do manto é externamente adjacente a uma nova camada de matriz não mineralizada, denominada **pré-dentina**. Esta constituirá, quando mineralizada, a primeira camada de dentina circumpulpar que, por seu lado, ficará adjacente a outra camada recém-formada de pré-dentina (figura 7). Durante este processo, os odontoblastos possuem um único prolongamento, que vai ficando rodeado pela dentina mineralizada na sua extremidade mais distal e rodeado pela pré-dentina adjacente ao corpo do odontoblasto (Katchburian e Arana, 2004).

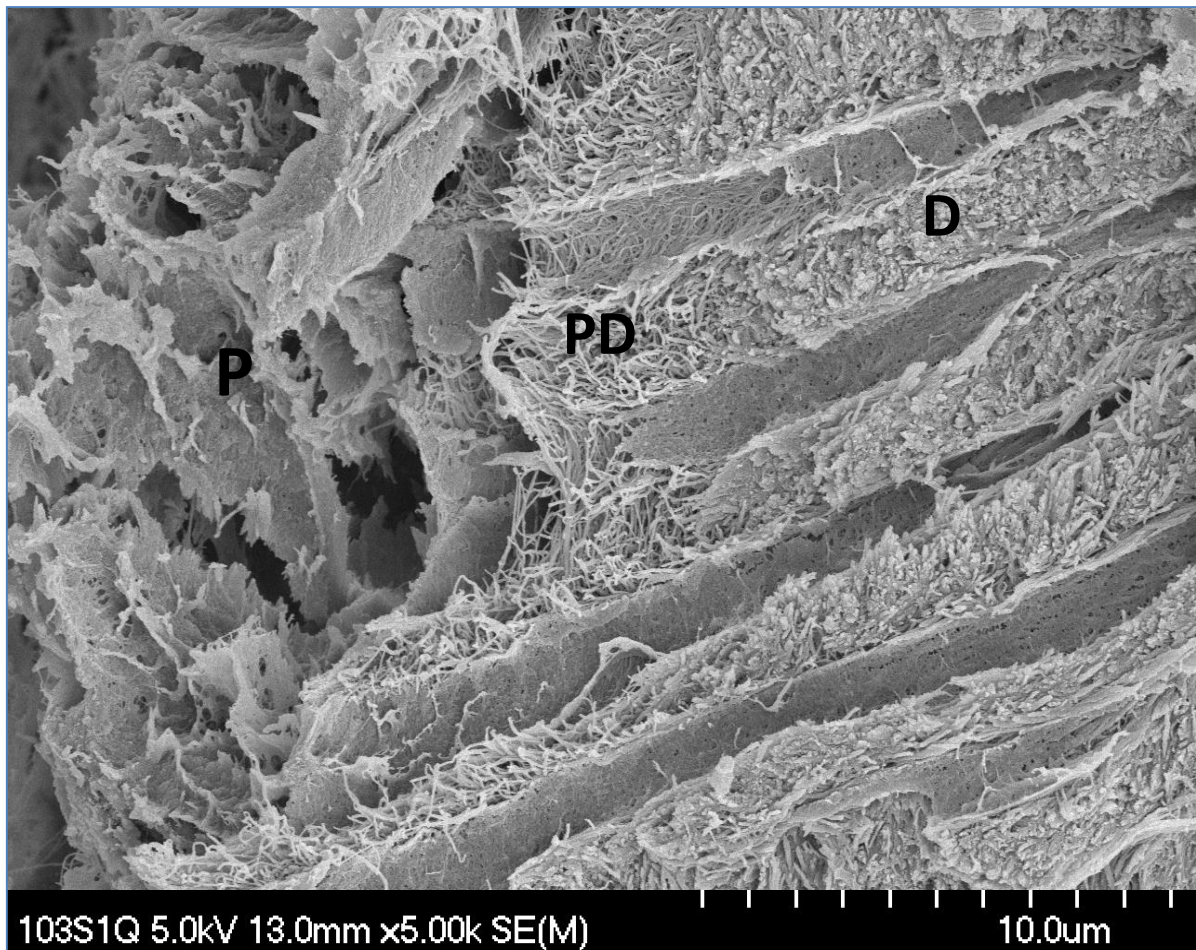


Figura 7 – Imagem de FESEM da parede do corno pulpar de um molar do rato Wistar. Observa-se a polpa (P), a pré-dentina (PD) e a dentina circumpulpar (D).

Durante a mineralização inicial da dentina permanece um espaço em volta do prolongamento odontoblástico; quando se atinge a espessura de 60-100µm, começa a ser secretada, provavelmente através das extremidades distais dos prolongamentos, uma fina matriz orgânica de composição distinta, quase desprovida de fibras colagêneas, que se mineraliza rapidamente, tornando-se ainda mais densa e homogeneamente calcificada do que a dentina inicialmente formada. Essa camada muito fina em volta dos prolongamentos é denominada **dentina peritubular** e forma a parede do túbulo dentinário em toda a sua extensão. A restante dentina é a **dentina intertubular** e representa a maior parte do tecido dentinário.

Embora no início da dentinogênese a dentina peritubular comece a ser formada após a dentina intertubular, uma vez formados aproximadamente 200µm de dentina, as duas passam a surgir simultaneamente, persistindo esse padrão até ao fim da dentinogênese circumpulpar (Katchburian e Arana, 2004).

Assim, a dentina circumpulpar vai sendo formada por aposição, enquanto os odontoblastos recuam em direção à polpa dentária e novas camadas de pré-dentina são depositadas, deixando o prolongamento e as suas numerosas ramificações rodeados por dentina peritubular, porém, com uma camada muito fina de material não mineralizado entre eles, o espaço periodontoblástico. Desta forma, a parede de dentina peritubular que aloja o prolongamento e esse estreito espaço tomam a forma de um longo túnel denominado **túbulo dentinário**.

Os numerosos canalículos oriundos do túbulo contêm as ramificações do prolongamento odontoblástico. Uma vez formada, aproximadamente, metade da espessura total da dentina, o prolongamento odontoblástico começa a retrair-se enquanto continua a deposição de nova pré-dentina.

Durante o período de formação da dentina primária, são depositados e calcificados 4 µm de pré-dentina por dia. Após a oclusão e função, esta atividade diminui para 1,0 a 1,5 µm por dia (Avery e Chiego, 2006).

Os túbulos dentinários aumentam de tamanho pela perda da dentina intratubular (ou peritubular). Esta dentina é cerca de 40% mais calcificada do que a restante dentina, mas está sujeita à descalcificação provocada pelas cáries ou pela acção de ácidos na preparação cavitária, pois removem a “smear layer” (Pashley, 1992; Avery e Chiego, 2006).

A dentina peritubular é mais opaca e mais frágil do que a dentina intertubular.

A dentina intertubular é mais fibrosa do que a dentina peritubular.

A dentina é assim permeada por túbulos, os túbulos dentinários, que contêm no seu interior os prolongamentos das células responsáveis pela formação do tecido, os odontoblastos (figura 8), bem como um pequeno volume de fluido extracelular (Berkovitz *et al.*, 2004).

A **dentina coronária** é a dentina que se localiza na coroa e apresenta diferenças estruturais e de composição relativamente à dentina radicular. Essas diferenças são, presumivelmente, devidas às contribuições distintas em termos do controlo e conteúdo do epitélio interno do esmalte na coroa, o qual vai participar na formação do esmalte, e da bainha epitelial radicular que, após o início da dentinogénese radicular, não sofrerá maior diferenciação, mas fragmentará (Berkovitz *et al.*, 2004), formando os restos epiteliais de Malassez (Katchburian e Arana, 2004).

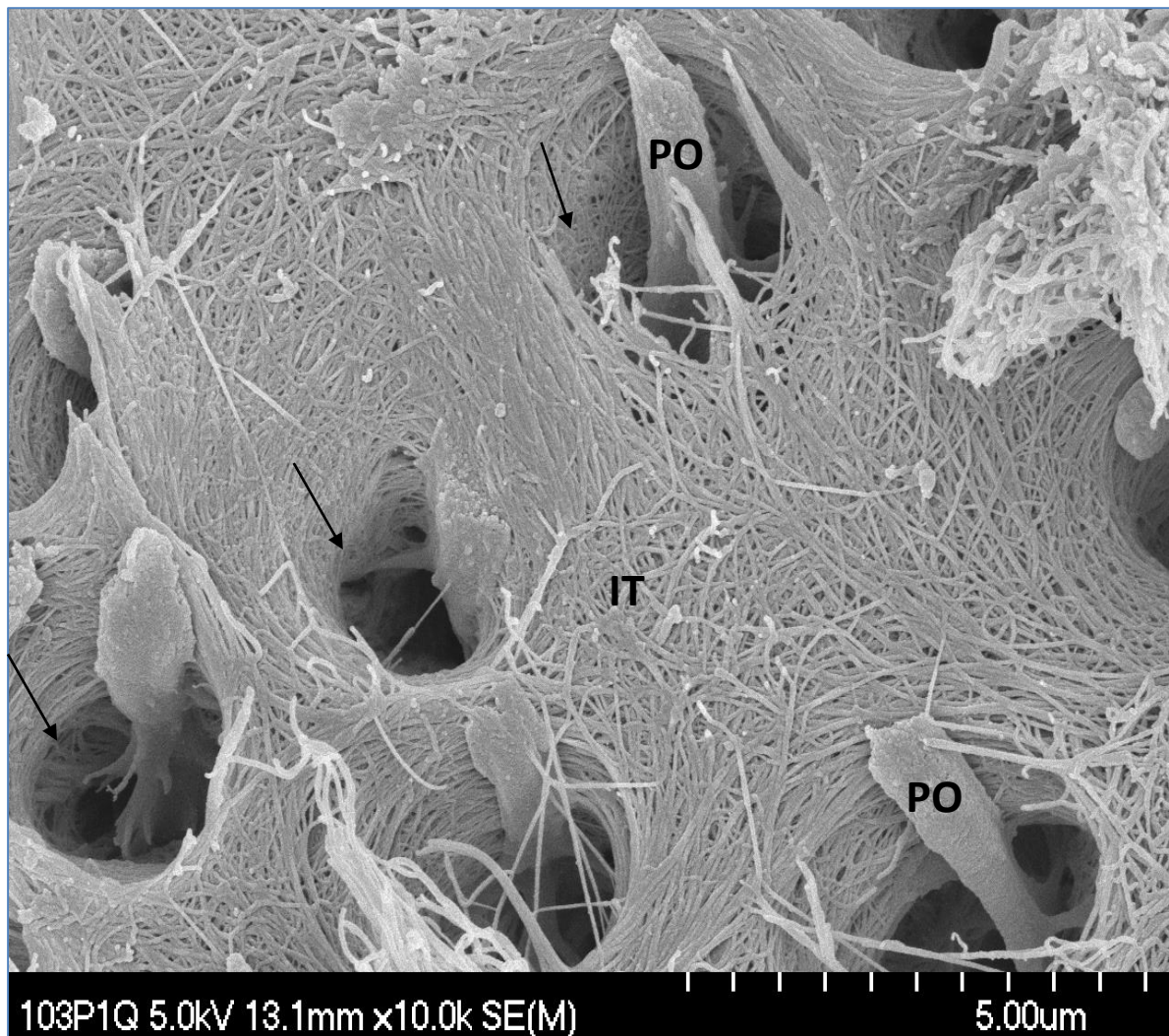


Figura 8 – Imagem de FESEM onde se observam os túbulos dentinários (setas), a malha de colagénio na dentina intertubular (IT) e alguns prolongamentos odontoblásticos no interior dos túbulos (PO).

As fibras de colagénio mais espessas da região coronária dispõem-se perpendicularmente à lâmina basal, enquanto as fibras colagêneas mais espessas da primeira camada de dentina radicular se dispõem paralelamente ao longo eixo da raiz.

Sabe-se ainda que a dentina coronária se forma a uma velocidade ligeiramente maior do que a dentina radicular.

A **dentina cervical** é uma zona de dentina que faz a transição entre a dentina coronária e a dentina radicular. Este tipo de dentina é muito semelhante em termos estruturais e de composição à dentina radicular.

A **dentina radicular** é formada pelos odontoblastos que se diferenciam a partir das células epiteliais de Hertwig.

Uma particularidade da dentina radicular é a existência da “capa ou camada granulosa de Tomes”. Esta camada encontra-se na parte mais periférica da dentina radicular, na união cimento-dentinária. Aparece como uma série de grânulos escuros, sem matriz de colagénio e, por isso, sem calcificação. Estende-se ao longo da raiz, sendo os grânulos mais numerosos no vértice do que na união cimento-esmalte. Pensa-se que estes grânulos representam pequenos espaços que resultam da ramificação (em forma de ansas) dos prolongamentos odontoblásticos durante a formação da camada mais externa da dentina radicular (Katchburian e Arana, 2004).

Linhas estruturais da dentina

A formação da matriz orgânica de dentina e a sua consequente mineralização seguem um padrão rítmico, i.e., longos períodos de formação de dentina são seguidos por curtos períodos de repouso. Este facto determina a formação de linhas incrementais perpendiculares ao longo eixo dos túbulos dentinários denominadas **linhas de von Ebner** (figura 9). Nos dentes humanos, a distância entre estas linhas é de aproximadamente 20 µm.

Outras linhas, mais acentuadas, podem ser observadas na dentina como consequência de distúrbios ou alterações metabólicas que ocorrem durante a dentinogénese. São as **linhas de Owen** e têm distâncias variáveis entre elas, variando ainda quanto ao número.

A **linha neonatal** resulta de um período mais longo de repouso na formação dos tecidos dentários que ocorre no momento do nascimento; esse período é de aproximadamente 15 dias. A linha neonatal é observada na dentina de todos os dentes decíduos e nas cúspides dos primeiros molares permanentes.

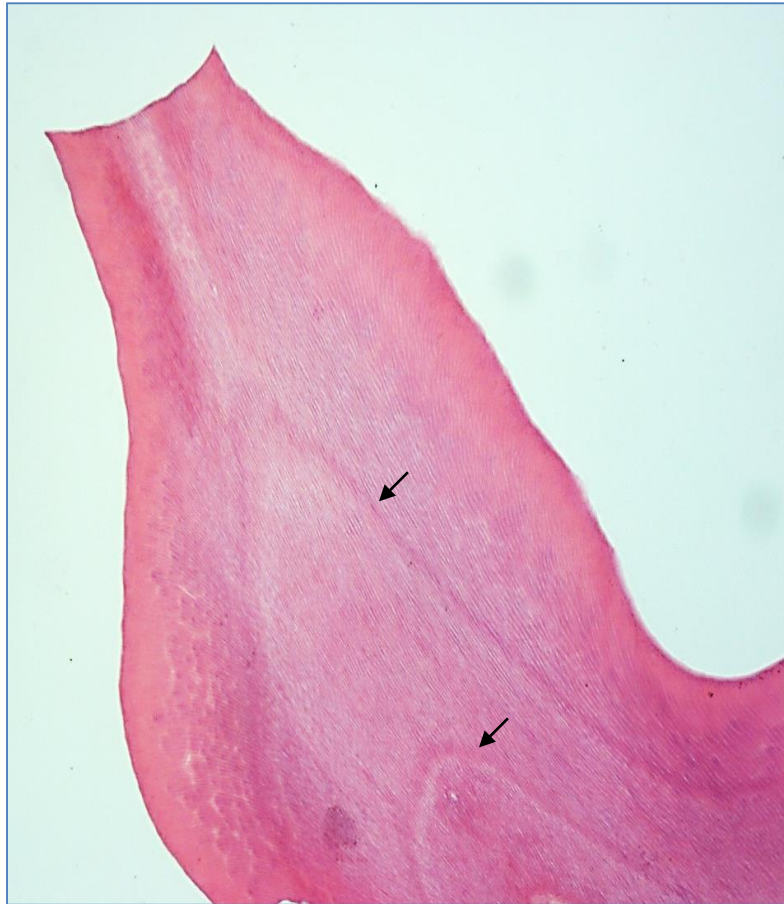


Figura 9 - Linhas incrementais da dentina (von Ebner) (setas).
Molar do rato Wistar. HE, 10x.

Dentina Secundária

A deposição de dentina ocorre durante toda a vida, mas a um ritmo mais lento. A camada formada após o encerramento do ápice radicular é denominada dentina secundária. É estruturalmente semelhante à dentina primária, distinguindo-se pela direção dos túbulos (Katchburian e Arana, 2004).

Nos dentes molares a dentina secundária é depositada em maior quantidade nas faces oclusais e no pavimento da câmara pulpar (Berkovitz *et al.*, 2004) do que nas paredes laterais da coroa. Este facto, como discutiremos adiante, parece relacionar-se com a proteção dos cornos pulpares quando ocorre o desgaste oclusal (Avery e Chiego, 2006).

Nos dentes anteriores, a dentina apresenta maior espessura na face palatina ou lingual. Nos canais radiculares, a dentina é depositada uniformemente em todas as suas paredes (Katchburian e Arana, 2004).

A matriz dentinária que rodeia a dentina tubular chama-se dentina **peritubular** ou **intratubular** (Avery e Chiego, 2006) e está presente em toda a dentina exceto na proximidade da polpa. Forma um colar hipermineralizado à volta dos túbulos e a denominação de intratubular deve-se ao facto de esta dentina ser formada dentro e a partir dos túbulos. Este tipo de dentina não se encontra nos túbulos dentinários da dentina interglobular nem na pré-dentina, porque são zonas de deficiente mineralização e não mineralizadas, respectivamente. Por outro lado, a dentina intratubular preenche completamente os túbulos em zonas hipermineralizadas como a junção amelodentinária que recobre os cornos pulpaes, e pode observar-se também nos túbulos periféricos da raiz perto do cimento. Estas regiões apresentam túbulos muito pequenos e são zonas onde, provavelmente, os estímulos externos têm influência (Avery e Chiego, 2006).

Dentina Terciária

É produzida em resposta a vários estímulos externos, como o atrito, erosão, abrasão, cáries e preparação cavitária em tratamentos dentários (Ten Cate, 1998; Katchburian e Arana, 2004; Summitt *et al.*, 2006), microinfiltração em torno das restaurações e dos traumas (Berkovitz *et al.*, 2004).

A dentina é um tecido dinâmico sujeito continuamente a alterações fisiológicas e patológicas na sua composição e microestrutura (Stanley *et al.*, 1983; Pashley, 1989; Summitt *et al.*, 2006).

A dentina terciária apresenta uma estrutura irregular e distinguem-se dois tipos: dentina reativa e dentina reparadora.

A dentina reativa constitui uma tentativa dos odontoblastos de formar uma barreira, restabelecendo a espessura de dentina, ficando, assim, mais afastados dos agentes agressores (Katchburian e Arana, 2004). É a dentina formada em resposta a uma agressão na qual, embora o dano tenha sido interrompido e alguns odontoblastos morram, os odontoblastos sobreviventes recuperam e continuam a formar dentina, cuja estrutura, dependendo da intensidade do estímulo, apresentará alguma irregularidade e um menor número de túbulos (Berkovitz *et al.*, 2004).

A dentina terciária do tipo reparadora é formada por células indiferenciadas da polpa, originando, na maioria das vezes, um tecido do tipo osteóide.

Dentina esclerótica ou dentina transparente é o termo que denomina a dentina cujos túbulos estão completamente obliterados. Esta denominação deve-se ao aspeto transparente que a dentina apresenta quando os túbulos não estão presentes. A quantidade de dentina esclerótica aumenta com a idade e acredita-se que constitua outro mecanismo de proteção pulpar, tal como a dentina reparadora. A permeabilidade para a polpa deixa de existir nestas áreas e a dentina esclerótica encontra-se em zonas de atrito, abrasão, fraturas e cáries (Tay e Pashley, 2004; Avery e Chiego, 2006).

Fatores de crescimento e moléculas “sinalizadoras” são libertadas nas agressões dentinárias e/ou nas desmineralizações para ativarem a dentina terciária reparativa e iniciarem o processo de mobilização das defesas pulpares (Summitt *et al.*, 2006). A barreira de proteção do tecido pulpar está diretamente relacionada com a impermeabilidade dos túbulos dentinários.

Inervação da dentina

Os túbulos dentinários contêm numerosas terminações nervosas na pré-dentina e na dentina circumpulpar a uma distância da polpa de cerca de 100 a 150 μm . A maioria destas pequenas terminações vesiculadas localiza-se nos túbulos da zona da coroa, junto dos cornos pulpares. Os nervos e as suas terminações encontram-se intimamente relacionados com os prolongamentos odontoblásticos dentro dos túbulos dentinários. Arwill *et al.*, (1973) afirmaram que estas estruturas “nerve-like” podiam ser observadas em 42,5% dos túbulos dentinários. No entanto, estas terminações não foram encontradas no interior dos túbulos dentinários da dentina do gato nos estudos realizados por Holland (1976). Podem existir terminações únicas ou podem ser várias porções dilatadas e estreitas. Em qualquer dos casos, as terminações nervosas estão cheias de pequenas vesículas, electrodensas ou electrolucentes, dependendo se houve, ou não, descarga da substância neurotransmissora (Bhaskar, 1991). Acredita-se que a maioria destas terminações nervosas são prolongamentos terminais das fibras nervosas mielinizadas da polpa dentária. Os nervos somato-sensitivos aferentes primários da dentina e da polpa projetam-se no complexo nuclear trigeminal descendente.

POLPA

A polpa dentária é a estrutura interna do dente, que ocupa a cavidade central do dente, está encapsulada nas paredes de dentina e é formada por tecido conjuntivo laxo, vascularizado e innervado (Avery e Chiego, 2006).

Consideramos na polpa a porção coronária e a porção radicular. A porção coronária é mais larga do que a porção radicular e contém mais elementos celulares, fibras, nervos e vasos sanguíneos; esta porção segue o contorno da superfície da coroa, descrevendo uma área denominada de câmara pulpar. Consideramos ainda os cornos pulpares – protusões que acompanham as cúspides do dente (logo, o número de cornos pulpares depende do número de cúspides que o dente possui) (Williams *et al.*, 1995).

A câmara pulpar é única e comum para as múltiplas porções radiculares da polpa.

A porção radicular aloja-se nos canais radiculares, desde a região cervical até ao ápice da raiz. É única nos dentes anteriores e múltipla nos dentes posteriores, muitas vezes, em concordância com o número de raízes desses dentes (Bhaskar, 1991).

A abertura da porção radicular no periodonto corresponde ao forame apical.

As principais células da polpa são os fibroblastos, os odontoblastos e as células mesenquimatosas indiferenciadas. Os macrófagos e os linfócitos estão também presentes na polpa (Avery e Chiego, 2006). As células odontoblásticas serão detalhadamente referidas adiante. Para além destes elementos celulares, devemos ter em conta a rica vascularização e inervação do tecido pulpar.

Em termos histológicos, distinguimos na polpa, da superfície para o centro: a zona odontoblástica, que corresponde à porção mais próxima da dentina circumpulpar, e onde se encontram os corpos dos odontoblastos; a zona acelular ou de Weil, que permite algum movimento aos corpos dos odontoblastos e a zona celular, rica em fibroblastos e células mesenquimatosas indiferenciadas (Bhaskar, 1991).

Como referimos, durante o desenvolvimento do dente, a diferenciação dos odontoblastos ocorre sob o controlo da interacção célula a célula e pela forte sinalização molecular entre os componentes da matriz extracelular e as células (Magloire *et al.*, 2004). A diferenciação terminal dos odontoblastos acontece em poucas horas e dá origem à secreção da matriz orgânica da dentina, a já referida pré-dentina.

À medida que a dentinogénese se desenvolve, existe uma deposição contínua de pré-dentina em direcção à polpa. Em condições normais, os odontoblastos mantêm a sua

função secretora de dentina circumpulpar ao longo da vida do dente, mas a um ritmo mais lento.

No interior dos túbulos dentinários encontra-se o prolongamento do odontoblasto e o fluido dentinário. Este conteúdo intratubular representa uma barreira selectiva entre a polpa e a dentina. Os odontoblastos regulam, pelo menos, a transferência do fluido, concretamente as moléculas ou iões desde os túbulos dentinários até ao tecido pulpar e vice-versa (efluxo do fluido e moléculas desde os capilares até à matriz extracelular) (Magloire *et al.*, 2004).

MORFOLOGIA E ATIVIDADE DOS ODONTOBLASTOS

Os odontoblastos são células colunares localizadas na periferia da polpa dentária. Derivam das células ectomesenquimatosas, que provêm das células da crista neural durante o desenvolvimento craniofacial (Arana-Chavez e Massa, 2004; Hall e Gillis, 2013).

O odontoblasto é reconhecido como uma célula pós-mitótica, que se diferencia na fase tardia do desenvolvimento do dente (fase de sino).

Durante a dentinogénese, a função primária dos odontoblastos é a síntese e secreção dos componentes da matriz extracelular da dentina, a pré-dentina e, subsequentemente, a mineralização da matriz (Kawasaki e Weiss, 2008). Estas células transportam activamente os iões de cálcio para o local de mineralização, e este torna-se um mineral cristalino na dentina, pela deposição sobre um substrato de fibras de colagénio do tipo I e controlado pela proteína não-colagénia predominante na dentina, isto é, a fosfoproteína dentinária (DPP) (Berkovitz *et al.*, 2004).

Apesar deste papel secretor, o aspeto morfológico do odontoblasto pode variar muito consoante o seu ciclo de vida (Takuma e Nagai, 1971; Fox e Heeley, 1980; Couve, 1986; Romagnoli *et al.*, 1990).

Nos mamíferos, os odontoblastos são células de longa vida, dispostas em paliçada na interface polpa-dentina (Couve *et al.*, 2013) (figura 10).

O odontoblasto apresenta o corpo na polpa dentária e os prolongamentos no interior dos túbulos dentinários.

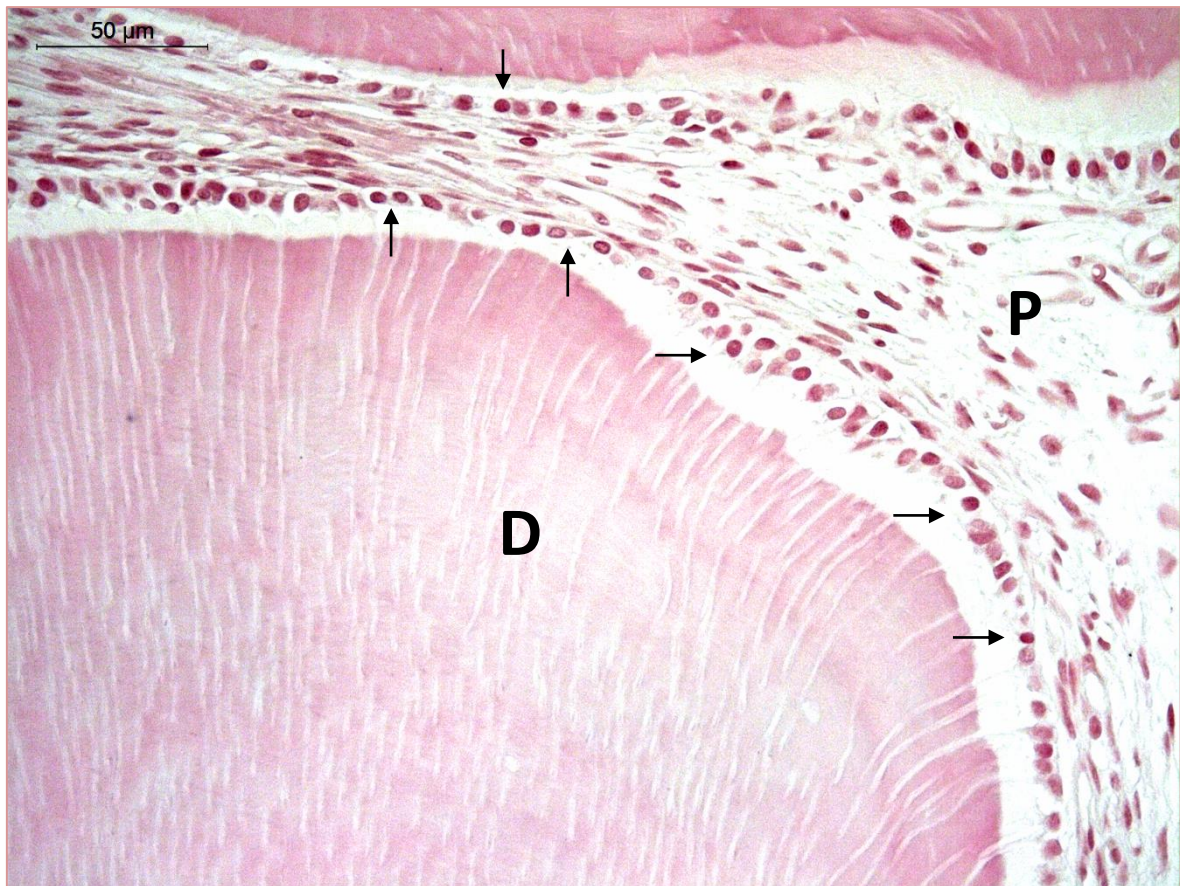


Figura 10 – Imagem MO do dente do rato Wistar mostrando a disposição dos odontoblastos em paliçada na interface entre a polpa (P) e a dentina (D) (setas). HE, 40x.

No humano, a forma e a disposição dos corpos dos odontoblastos não é uniforme ao longo da polpa. Na zona da polpa coronária são mais longos e cilíndricos e na zona da polpa radicular são mais cubóides. Junto ao ápice do dente adulto, os odontoblastos têm forma oval (Bhaskar, 1991).

As alterações morfológicas dos odontoblastos estão diretamente relacionadas com a sua capacidade para responder às agressões à dentina, como forma de proteção pulpar. Alterações na morfologia dos odontoblastos refletem a sua atividade secretora (Murray *et al.*, 2003).

A transição funcional entre a dentinogénese primária e a dentinogénese secundária é acompanhada de alterações significativas no fenótipo dos odontoblastos (Couve *et al.*, 2013). O que acontece é que se transita de uma fase de alta e diferenciada actividade secretora para uma fase onde essa actividade é reduzida pela capacidade autofágica da própria célula, dando lugar à chamada fase de maturação dos odontoblastos (Couve *et*

al., 2013) (figura 11). Com o avanço da idade, os odontoblastos maduros acumulam depósitos de lipofusцина.

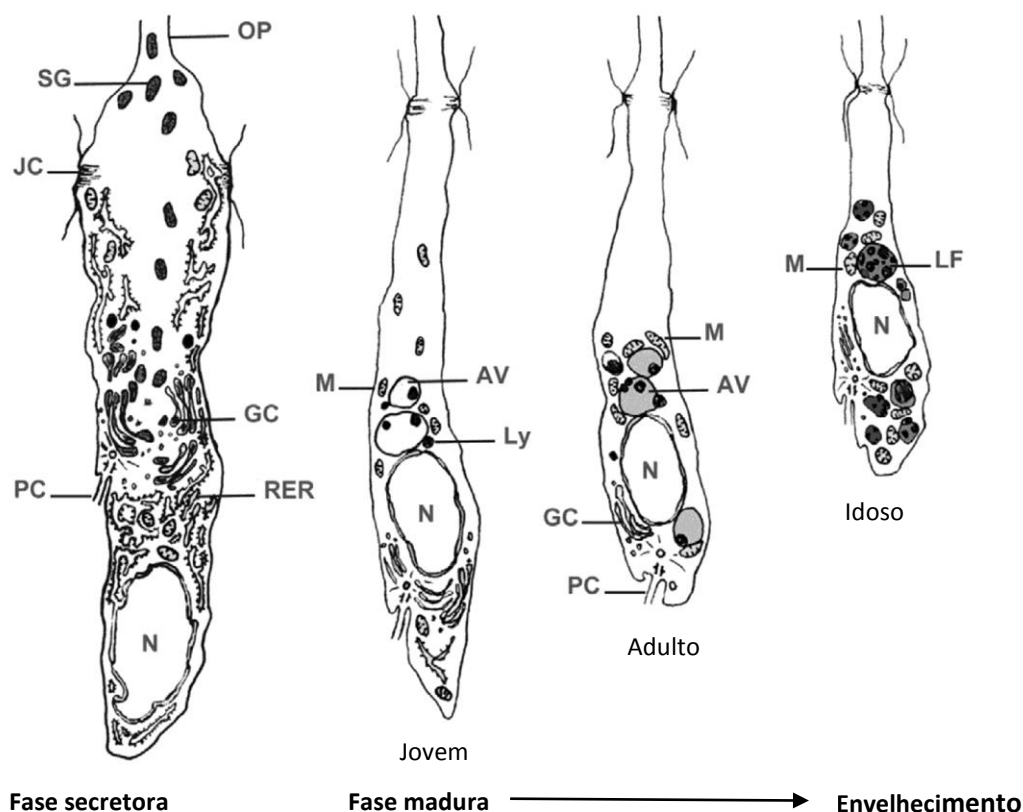


Figura 11 – Esquema representativo do ciclo de vida do odontoblasto humano. Durante o desenvolvimento do dente, os odontoblastos secretores são as células “formadoras de dentina”. Após a erupção do dente, os odontoblastos da região coronária da polpa, reduzem a sua actividade secretora e atingem a fase madura, caracterizada pela presença de vacúolos autofágicos (AV). GC-Complexo de Golgi; JC – Complexos juncionais; Ly – Lisossomos; M – Mitocôndria; N – Núcleo; OP – Prolongamento odontoblástico; PC – Cílio primário; RER – Retículo endoplasmático rugoso; SG – Grânulos de secreção. (Adaptado de Couve *et al.*, 2013).

A regulação local da actividade dos odontoblastos, tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas, envolve provavelmente, factores biológicos (provenientes da polpa e/ou da dentina) e estímulos mecânicos.

A diferenciação dos odontoblastos requer a sinalização trópica do ambiente celular, que pode ser detectada através do cílio primário (Couve *et al.*, 2013). O cílio primário foi

observado em todas as fases do ciclo de vida dos odontoblastos (figura 11) (Couve, 1986; Magloire *et al.*, 2004; Couve *et al.*, 2013).

Na verdade, sob condições fisiológicas, a morfologia do odontoblasto é a de uma célula com atividade secretora, mas alterações patológicas no tecido dentário podem levar a alterações morfológicas no odontoblasto. Estas alterações podem sugerir mais do que uma relação entre a morfologia e o comportamento secretor destes odontoblastos que, frequentemente perdem o seu aspeto colunar nestas condições, mas podem secretar a matriz de dentina terciária (se bem que, muitas vezes, displásica) em taxas muito altas (Baume, 1980).

No início da diferenciação, os odontoblastos aproximam-se e unem-se através de complexos juncionais e junções comunicantes (“gap junctions”) (Katchburian e Arana, 2004). Nas células epiteliais, as junções oclusivas (“tight junctions”) dividem a membrana plasmática num compartimento apical e num compartimento basolateral. Acredita-se que as “tight junctions” desempenhem um papel importante na polarização final dos odontoblastos, nomeadamente na exocitose e redistribuição dos organelos (Arana-Chavez e Katchburian, 1997). Nos dentes sãos, este tipo de uniões formam uma barreira estável entre os corpos dos odontoblastos e a pré-dentina (Turner *et al.*, 1989; Bishop e Yoshida, 1992), mas que pode ser desestabilizada em resposta aos traumas (Turner *et al.*, 1989).

A organização da membrana plasmática dos odontoblastos é peculiar. De acordo com estudos recentes em dentes humanos (Tjäderhane *et al.*, 2013), a polaridade da membrana plasmática dos odontoblastos é diferente da das células epiteliais, e acredita-se que a porção que limita a superfície pulpar do odontoblasto corresponde à membrana apical, enquanto a porção que circunda o prolongamento odontoblástico corresponde à porção basolateral da membrana.

Alguns estudos referem que o odontoblasto, juntamente com a rede de fibras nervosas trigeminais, formam um complexo órgão sensorial, capaz de detectar e transmitir alterações na temperatura, estímulos mecânicos e dor (Byers e Lin, 2003; Magloire *et al.*, 2010; Farahani *et al.*, 2011).

DINÂMICA DO COMPLEXO PULPO-DENTINÁRIO

A dentina e a polpa são dois tecidos intimamente relacionados sob o ponto de vista morfológico, funcional e embriológico.

A polpa mantém a vitalidade da dentina e a dentina protege a integridade da polpa.

Hoje em dia, sabemos que é importante considerar o complexo dentina-polpa como um complexo dinâmico e interativo.

Os odontoblastos, estão organizados numa única camada de células, dispostas em paliçada, ao longo da interface entre o tecido conjuntivo laxo da polpa e o tecido mineralizado dos túbulos dentinários (figura 10).

Uma densa rede de axónios sensoriais, provenientes dos neurónios com origem nos ramos do gânglio trigeminal, estende-se até à região odontoblástica formando o plexo marginal no limite pulpo-dentinário (Magloire *et al.*, 2004).

A resposta deste complexo à maioria dos agentes agressores passa pela formação de dentina terciária. Quando os produtos resultantes do processo de cárie, toxinas e bactérias se aproximam dos tecidos pulpares, tanto os tecidos duros (dentina) como os tecidos moles (polpa) desencadeiam reações defensivas para proteger os túbulos e reparar o dano.

A polpa tem várias funções, nomeadamente a função indutora, formadora, nutritiva, sensorial, protetora e defensora ou reparadora (Avery e Chiego, 2006; Summitt *et al.*, 2006). A função indutora deve-se à interação entre o epitélio oral e a papila dentária durante a formação do dente; a função formadora, devido à formação de matriz dentinária por parte dos odontoblastos (Avery e Chiego, 2006; Summitt *et al.*, 2006); a função nutritiva, através do suprimento vascular, permite assegurar as necessidades metabólicas e de oxigénio necessárias ao dente; a função sensorial permite a nocicepção; a função protetora e defensora, resulta das respostas coordenadas do complexo pulpo-dentinário perante os agentes agressores, podendo incluir aspetos inflamatórios, antigénicos, neurogénicos e/ou formação de dentina terciária, promovendo a reparação do tecido.

A câmara pulpar apresenta características anatómicas especiais, pois é constituída por tecido ricamente innervado rodeado de paredes duras e inextensíveis. Desta forma, perante diferenças acentuadas de pressão, a polpa tem uma incapacidade de adaptação que, se aliada a outros fatores, pode provocar dores de intensidade variável, as denominadas barodontalgias. Os estudos de González Santiago *et al.*, (2004) em pessoal de voo revelaram que as barodontalgias são mais frequentes nos dentes posteriores e

sugerem que esta prevalência é explicada pelo facto do espaço correspondente à câmara pulpar nos dentes posteriores ser menor e a polpa reage de forma mais agressiva perante qualquer condição que cause compressão do tecido.

A invasão bacteriana dos túbulos dentinários ocorre quando a dentina é exposta em resultado de uma rutura na integridade do esmalte ou do cimento. A difusão dos produtos bacterianos para os túbulos dentinários em direção à polpa provoca resposta inflamatória do complexo dentina-polpa. Esta resposta pode eliminar a agressão e bloquear o caminho da infeção; quando isso não acontece, o resultado da invasão pode ser a pulpíte e a necrose pulpar, infeção dos canais e distúrbios periapicais (Love e Jenkinson, 2002).

Murray *et al.*, (2002) defendem que à diminuição da densidade celular da polpa corresponde uma menor capacidade reparadora após tratamentos restauradores.

De acordo com a teoria hidrodinâmica ou do fluido, estímulos como o calor, o frio, a pressão mecânica ou osmótica, afectam o movimento do fluido nos túbulos dentinários. Este movimento do fluido, seja para fora ou para dentro, estimula o mecanismo da dor nos túbulos por alteração mecânica dos nervos intimamente relacionados com os odontoblastos e seus prolongamentos. Assim, estas terminações podem atuar como mecanorreceptores quando são afectadas pela deslocação do fluido intratubular (Avery e Chiego, 2006).

Por outro lado, quando a dentina é exposta, a água intratubular consegue mover-se em resposta a estímulos térmicos, osmóticos, evaporativos ou estímulos tácteis (Pashley, 1996). Alterações dos fluidos da dentina são suficientes para exercer força (shear) sobre os odontoblastos, terminações nervosas, fibroblastos adjacentes e vasos sanguíneos, de modo a causar irritações mecânicas significativas, disrupção ou lesões, dependendo da magnitude da movimentação do fluido (Pashley, 1996). Mesmo na ausência de alterações do fluido, os túbulos preenchidos por água facilitam a difusão de agentes nocivos i.e., produtos bacterianos, substâncias que se difundem em direção à polpa, onde podem ativar o sistema imunitário, promovendo estímulos quimiotáticos, produção de citocinas e, conseqüentemente levar à inflamação pulpar e à dor (Pashley, 1996). Nesta perspetiva, a dentina é uma fraca barreira para os irritantes externos. No entanto, os tecidos pulpares reagem a estes estímulos aumentando a atividade dos nervos, vasos sanguíneos, sistema imunitário e *turnover* do fluido intersticial para tornar a dentina exposta menos permeável e, por outro lado, fisiologicamente, pelo aumento do fluxo *para fora*, ou microscopicamente, pela presença de proteínas nos túbulos, depósitos minerais, ou dentina terciária, aumentando as propriedades de barreira da dentina e fornecendo

proteção adicional aos tecidos pulpaes. Nestas reações, tanto a dentina como a polpa estão envolvidas no início do processo e na sua resolução. Estas respostas da polpa dentária à irritação da dentina demonstram a natureza dinâmica do complexo pulpo-dentinário (Pashley, 1996).

Os traumas oclusais sobre o dente, como as cargas excêntricas resultantes dos hábitos parafuncionais, também podem ter repercussões ao nível do complexo pulpo-dentinário, motivo pelo qual consideramos importante abordar mais adiante o desgaste dentário e os hábitos parafuncionais, como o bruxismo.

ENVELHECIMENTO DO DENTE

Sabemos que o dente, tal como os outros tecidos biológicos, também sofre desgaste fisiológico com a idade. No entanto, este processo natural é reconhecido e compensado pelos métodos preventivos e restauradores da dentisteria moderna sem que se atinjam condições patológicas de desgaste dentário.

Os sinais de envelhecimento dentário podem atingir diferentes porções do dente, desde os componentes mineralizados, como o esmalte e a dentina, até à polpa (Lovschall *et al.*, 2002).

No que respeita ao esmalte, é um tecido semipermeável, mas a sua permeabilidade vai diminuindo com a idade (Nanci, 2003).

O esmalte é um tecido susceptível ao desgaste, e à medida que a idade avança, a presença cumulativa de agentes agressores capazes de provocar desgaste dentário vai-se reflectindo no aspecto macroscópico e/ou microscópico do dente.

A cor do dente também vai escurecendo com o avanço da idade, uma vez que o esmalte deixa transparecer mais a cor da dentina.

A dentina secundária é depositada em toda a região circumpulpar ao longo da vida do dente.

Ao contrário da dentina secundária, que é fisiológica, a formação de dentina terciária ocorre nas paredes da câmara pulpar correspondentes aos locais afectados por agentes agressores, como a cárie.

Existe ainda um tipo fisiológico de dentina, a dentina esclerótica ou transparente, que habitualmente começa por se depositar na região radicular e aumenta linearmente com a idade (Perdigão, 2010).

Clinicamente, a constante deposição de dentina secundária durante a vida do indivíduo pode justificar a maior dificuldade no acesso à câmara pulpar e/ou canais radiculares durante os tratamentos endodônticos, realizados em pacientes de idade avançada (Katchburian e Arana, 2004).

Com o envelhecimento, especialmente na dentina radicular, os túbulos tornam-se completamente obliterados com a dentina peritubular formando dentina translúcida ou esclerótica. A dentina translúcida é particularmente significativa no ápice radicular e aumenta com a idade. Por esta razão, ela é estudada em medicina forense para auxiliar na determinação da idade com base nos dentes (Berkovitz *et al.*, 2004).

Como resultado da redução do diâmetro dos túbulos dentinários, existe também uma diminuição da permeabilidade na dentina (Perdigão, 2010).

Com o avançar da idade ocorre redução do volume da polpa, diminuição dos componentes celulares, aumento do colagénio, presença de massas calcificadas e redução dos suprimentos sanguíneo, linfático e nervoso (Katchburian e Arana, 2004).

Murray *et al.*, (2002) comprovaram que ao aumento da idade corresponde uma diminuição da celularidade pulpar, uma vez que diminui a densidade dos odontoblastos e dos fibroblastos pulpares. Os mesmos autores referem que as alterações relacionadas com a idade são assimétricas; e a diminuição da densidade celular é mais evidenciada na porção radicular do que na porção coronária (Murray *et al.*, 2002).

Com a idade há uma diminuição da espessura da camada de odontoblastos, em boa parte devido à redução do tamanho das células (Murray *et al.*, 2002; Couve *et al.*, 2012). Os estudos de Couve *et al.*, (2012) mostraram um aumento progressivo dos vacúolos autofágicos nos odontoblastos humanos em função da idade, denunciando uma grande actividade autofágica das células. Contudo, outros estudos (Rezzani *et al.*, 2012) sugerem que a acumulação de vacúolos autofágicos pode também dever-se a uma diminuição funcional da actividade lisossómica das células.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA ESTOMATOGNÁTICO DO RATO WISTAR

Os dentes dos roedores diferem em alguns detalhes dos dentes humanos. A espessura da camada de esmalte nos dentes dos roedores é cerca de 20 vezes mais fina do que a dos dentes humanos (Thylstrup e Fejerskov, 2001; Lima, 2003). Logo após a erupção, os dentes dos roedores são hipomineralizados e a manutenção pós-eruptiva pode continuar pelo menos por dois meses após a erupção, contrastando com os dentes humanos que estão completamente mineralizados no momento da erupção (Lima, 2003).

A morfologia dos dentes do rato também é diferente da humana, o rato apresenta molares que são atravessados por fissuras profundas e possui uma camada fina de esmalte, que nem sempre cobre o vértice das cúspides (Thylstrup e Fejerskov, 2001) (figura 12). No momento da erupção dentária, esta camada de esmalte está ainda pouco mineralizada, especialmente na base e partes laterais das fissuras.

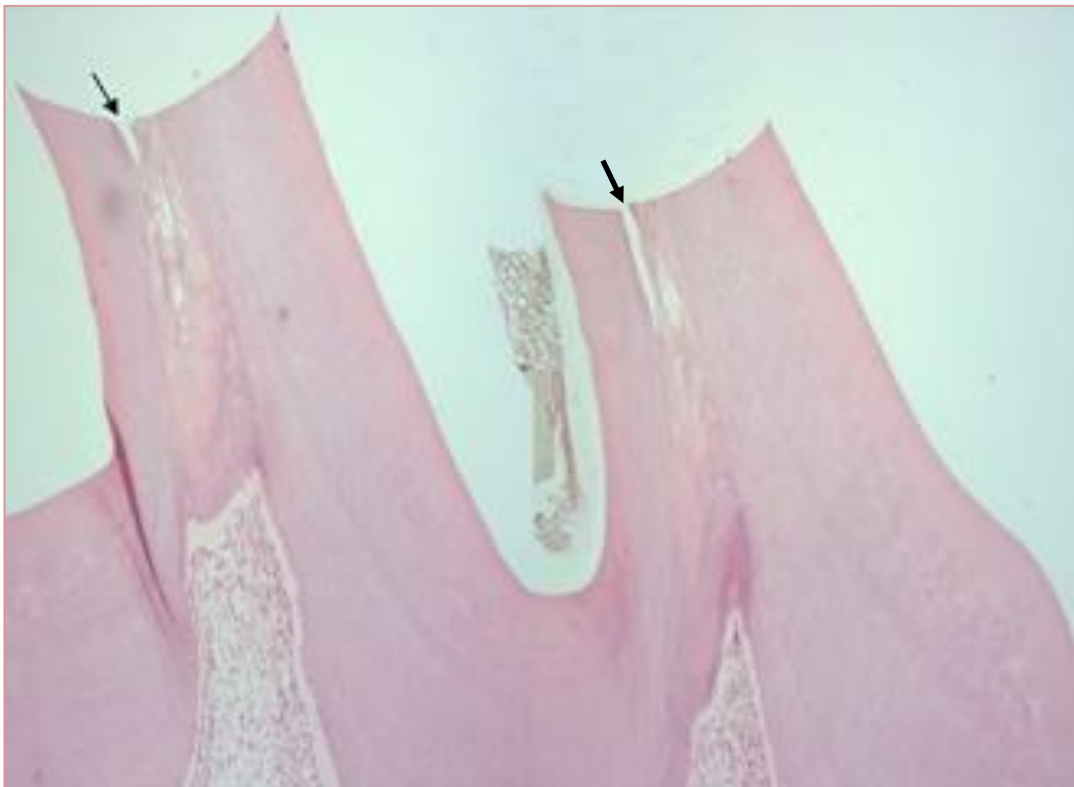


Figura 12 – Imagem de corte histológico de um molar do rato Wistar, mostrando duas das cúspides. Note-se que o vértice das cúspides não está coberto pelo esmalte observando-se pequenas fissuras (setas). HE 40x.

A arcada dentária do rato Wistar é constituída por dois longos incisivos ao centro, que se encontram separados, por um diastema, e por três molares de cada lado que completam a arcada (Cox e Jeffery, 2011). Não existem caninos nem pré-molares, apresentando uma anatomia oral simples quando comparada com a humana. No total, existem 16 dentes na boca do rato. Os dentes incisivos crescem continuamente e estão alinhados mantendo uma aresta de corte afiada (Suckow *et al.*, 2006). Se não houver um desgaste dos incisivos que compense o contínuo crescimento, os incisivos dos roedores podem apresentar um padrão de desgaste oclusal anormal e/ou um crescimento excessivo pela perda de contacto com o oponente (maloclusão) e esse crescimento pode ir até um milímetro por dia (Crossley e Aiken, 2004). Estes dentes demasiado erupcionados podem causar traumas na bochecha, língua, palato ou até úlceras e impedir os animais de se alimentarem (Dontas *et al.*, 2010).

A dentina dos incisivos está continuamente a formar-se e alterações na homeostasia do cálcio, hipovitaminoses A, D ou E e deficiências de magnésio (Mg) podem resultar em alterações na espessura e estratificação da dentina, bem como atrofias ou hipoplasias do esmalte (Kuijpers *et al.*, 1996).

Nos roedores, o músculo masseter é o principal responsável no movimento de encerramento da mandíbula (Turnbull, 1970; Cox *et al.*, 2012). O sistema estomatognático dos roedores tem-se adaptado para acompanhar não apenas a função de corte ao nível dos incisivos, e de moer ao nível dos molares, como também o movimento propalinal da mandíbula que permite estes dois tipos de movimento durante a mastigação. Estes movimentos são necessários nos roedores porque de outra forma seria impossível para os incisivos e para os dentes molares entrarem em oclusão ao mesmo tempo (Hiemae e Ardran, 1968; Cox *et al.*, 2012).

Anatomicamente, a articulação temporo-mandibular (ATM) do rato é semelhante à ATM do humano. Em ambas as espécies a ATM é uma diartrose com menisco (Kiliaridis *et al.*, 1999).

Os estudos mostram que a desoclusão ou maloclusão nos roedores pode afectar a cartilagem do côndilo mandibular ao nível celular, aumentando a actividade mitótica e acelerando a maturação dos condrócitos (Ramirez-Yanez *et al.*, 2004).

Apesar das diferenças que referimos em relação à dentição humana, os roedores continuam a ser um modelo animal muito usado entre a comunidade científica pelo fácil manuseio em laboratório (Festing, 1979), pela capacidade de resistência (Goto *et al.*, 1994), inclusivé às infeções (Farris e Griffith, 1963). Mas, igualmente importante é o facto

de os estudos que avaliam as reações da polpa e da dentina dos dentes molares do rato poderem ser, com as devidas reservas e limitações, extrapolados para o Homem. Desta forma, os dentes molares do rato têm servido de modelo em muitos estudos experimentais (Byers e Närhi, 1999).

RUÍDO INDUSTRIAL E STRESS

As condições causadoras de *stress* podem ser muito diversas, e o ruído industrial tem sido relatado em muitos estudos (Mercuri *et al.*, 1979; Folkman e Lazarus, 1980; Berglund e Lindvall, 1995; Lurie *et al.*, 2007) como um importante agente desencadeador e potenciador do *stress*. Acredita-se que o *stress* psicológico aumenta a vulnerabilidade do indivíduo, por exemplo, alterando as respostas imunes (Bolger e Zuckerman, 1995; Cohen *et al.*, 1999). Pode dizer-se que a relação entre o *stress* e a doença se baseia no pressuposto de que os agentes “stressantes” podem ser capazes de alterar o equilíbrio e homeostasia individual e isso pode repercutir-se física e/ou psicologicamente.

O *stress* pode ser definido como a soma de respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos (*stressores*) e que permitem ao indivíduo responder a determinadas exigências do meio ambiente e compensar o desgaste físico e mental causado por esse processo (Lazarus e Folkman, 1984; Chrousos e Gold, 1992; Sarafino, 1994; Lipp e Novaes, 2000; Gazzaniga e Heatherton, 2007).

O termo *stress* teve origem na física, onde designa a tensão e o desgaste a que estão sujeitos os materiais e, em 1936 foi usado pela primeira vez no sentido em que se usa hoje, pelo médico Hans Selye na revista científica *Nature*. É considerado “*stressor*” todo o estímulo capaz de causar *stress* (Busnello *et al.*, 2009).

A manutenção do estado de equilíbrio (homeostase) é essencial para a vida e é constantemente desafiado por condições internas ou externas ao organismo desencadeando um conjunto de respostas que visam minimizar os danos para o organismo (Ulrich-Lai e Herman, 2009).

Um evento *stressor* é caracterizado como um estímulo que ameaça o organismo, desencadeando um padrão de respostas físicas que o corpo utiliza para evitar ou escapar de uma condição avaliada como adversa (Gazzaniga e Heatherton, 2007).

Por outro lado, o impacto de um evento *stressor* pode ser variável em termos individuais e depende de uma série de factores que ajudam à superação das adversidades por um processo que, em física, se denomina de resiliência (Trombetta e Guzzo, 2002; Poletto e

Koller, 2006) e em psicologia se refere à capacidade e/ou habilidade que o indivíduo tem para superar adversidades e lidar com determinado evento *stressor* (Pinheiro, 2004; Poletto e Koller, 2006). A capacidade de resiliência por sua vez aumenta com as estratégias de *coping*, que são esforços empreendidos pelo indivíduo na tentativa de lidar com situações percebidas como *stressoras* (Dell’Aglío e Hutz, 2002; Dell’Aglío, 2003).

O *stress* envolve uma discrepância entre as exigências de uma dada situação e os recursos do sujeito perante essa situação (Santos e Castro, 1998). Os mecanismos de adaptação ao *stress* (que em psicologia, como referimos são denominados *coping*) são processos através dos quais os sujeitos tentam gerir essa discrepância, entre as exigências a que estão submetidos e os recursos que possuem, em situações de *stress* (Santos e Castro, 1998). É um esforço para reduzir ou neutralizar os efeitos e/ou as causas do *stress* (Lazarus e Folkman, 1984; Lazarus e Folkman, 1987). Os mecanismos de adaptação ou *coping* envolvem trocas contínuas com o meio, são um processo dinâmico (Santos e Castro, 1998). É por isso relevante o facto de os estudos (Pereira e Tricoli, 2003) mostrarem que o meio ambiente tem influência no desenvolvimento da resistência ou da vulnerabilidade ao *stress* e sabe-se que a prevalência de eventos *stressores* ambientais tem aumentado ao longo dos anos (Busnello *et al.*, 2009).

Vários estudos (Zuardi, 2009) distinguem as respostas por exposição aguda ao *stress* das respostas por exposição crónica ao *stress*, referindo-se aos estádios de adaptação e habituação. O termo “adaptação” era muito usado e generalizado, mas tem vindo a ser substituído no campo da neurobiologia pelo termo “habituação”.

A resposta aguda ao *stress* é adaptativa e prepara o organismo para enfrentar o desafio (Grisson e Bhatnagar, 2009; Zuardi, 2009). O objectivo da resposta aguda ao *stress* é essencialmente o de induzir uma rápida mobilização de energia nos locais apropriados (Zuardi, 2009). Nesse sentido, o aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial, da frequência respiratória e a mobilização de glicose, contribuem para a disponibilização dessa energia.

As respostas ao *stress* são mediadas pelo sistema nervoso autónomo (SNA) e pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), com acções complementares através de todo o organismo (Zuardi, 2009).

O SNA é o responsável pela resposta mais imediata à exposição ao *stressor* provocando alterações rápidas no estado fisiológico dos órgãos por intermédio dos componentes simpático e parassimpático (Ulrich-Lai e Herman, 2009).

Por outro lado, o *stress* também activa o eixo HHA, o que resulta num aumento dos níveis de glucocorticoides circulantes (Zuardi, 2009). Os estímulos causadores de *stress* desencadeiam um circuito neuronal complexo e específico do *stress*. O núcleo paraventricular do hipotálamo estimula a libertação de corticotrofina e de outras hormonas, nomeadamente arginina e vasopressina, para a circulação portal hipofisária. Estes produtos de secreção interagem para libertar a hormona adrenocorticotrófica na corrente sanguínea. Esta hormona vai estimular o córtex da glândula adrenal a libertar glucocorticoides. O principal glucocorticoide nos roedores é a corticosterona. Nos primatas, o cortisol é o principal glucocorticoide libertado nestas circunstâncias (de Kloet, 2000).

O aumento de glucocorticoides na corrente sanguínea leva a um *feedback* negativo ao nível da hipófise e do cérebro, capaz de inibir a activação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Dallman *et al.*, 1987).

Os glucocorticoides também exercem efeitos fisiológicos de grande alcance, incluindo a supressão da actividade do sistema imunitário (Dallman, 2007).

“Habituação” é definida como uma diminuição da resposta comportamental após a repetição do mesmo estímulo e que não envolve adaptação sensorial / fadiga sensorial ou fadiga motora (Rankin *et al.*, 2009). Grisson e Bhatnagar (2009) concluíram que a magnitude de activação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA) que ocorre em resposta a um agente *stressor*, diminui com a exposição repetida a esse agente *stressor*.

É evidente que existem diferenças individuais na resposta ao *stress* baseadas nas experiências vividas.

Há dois pontos-chave da resposta ao *stress* (McEwen, 1998). Por um lado, o organismo responde a muitos estímulos, libertando mediadores químicos, como as catecolaminas que aumentam a frequência cardíaca e a pressão arterial. Esses mediadores promovem a adaptação a um “*stressor*” agudo, bem como a reações simples do dia-a-dia, como subir escadas. Por outro lado, a elevação crónica destes mesmos mediadores, por exemplo, aumento da frequência cardíaca crónica e da pressão sanguínea, podem levar a alterações fisiopatológicas, designadamente no sistema cardiovascular.

Devido às ações paradoxais destes mediadores na proteção e danos, é inevitável o uso do termo *alostase*, que literalmente significa “alcançar a estabilidade através da mudança”. Este termo foi introduzido por Sterling e Eyer (1988) para se referir ao processo ativo pelo qual o corpo responde aos eventos diários e mantém a homeostase.

Quando é aumentado cronicamente, o período de alostase, pode desencadear processos fisiopatológicos, que resultam do desgaste pelo *stress* e/ou pela gestão ineficiente da alostase; equivale a não desligar a resposta quando esta já não é mais necessária (McEwen e Stellar, 1993; McEwen, 1998; McEwen e Wingfield, 2003).

Além da adrenalina e noradrenalina, há muitos mediadores que participam na alostase, e estão ligados entre si numa rede de regulação que não é linear, o que significa que cada mediador tem a capacidade de regular a actividade de outros mediadores, por vezes de uma forma bifásica. Por exemplo, os glucocorticoides produzidos pelo córtex adrenal em resposta à ACTH a partir da hipófise são as outras "hormonas do *stress*." Contudo, as citocinas pro e anti-inflamatórias são produzidas por muitas células no corpo, regulam-se mutuamente e são, por sua vez, reguladas por glucocorticoides e catecolaminas, isto é, enquanto as catecolaminas podem aumentar a produção de citocina pró-inflamatória (Bierhaus *et al.*, 2003), os glucocorticoides são conhecidos por inibir a produção desta (Sapolsky *et al.*, 2000).

Na atualidade, e em síntese, a comunidade científica defende que, a primeira via de resposta ao *stress* é a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HHA), que promove a libertação de hormonas que estimulam a libertação de glucocorticóides pelo córtex da glândula adrenal (Armario, 2006).

A segunda via de resposta ao *stress* é a do sistema nervoso simpático, que promove a libertação de adrenalina e noradrenalina a partir da medula adrenal (Anisman *et al.*, 1996; Seiffert *et al.*, 2002; Armario, 2006).

A ativação, pelo *stress*, do SNA e do eixo HHA interfere num conjunto de sistemas com repercussões ao nível de vários órgãos, nomeadamente no sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal e metabólico, imunológico, entre outros.

Por outro lado, é sabido que os hábitos parafuncionais podem ser exacerbados pelo *stress*, o que em nosso entender, justifica uma pesquisa mais detalhada sobre os mesmos e sobre as suas repercussões ao nível do sistema estomatognático.

HÁBITOS PARAFUNCIONAIS

Os hábitos parafuncionais são hábitos não relacionados com a execução das funções normais do sistema estomatognático, como a deglutição, a mastigação e a fonação. Segundo MacFarlane *et al.* (2003a, 2003b), fatores mecânicos locais, como os hábitos parafuncionais, apresentam um papel importante na etiologia da dor orofacial, podendo a sua influência variar com a tolerância do paciente à dor e as suas diferentes respostas

bioquímicas e fisiológicas a estes fatores. Para Molina *et al.* (2001), de entre os hábitos orais que afetam as estruturas mastigatórias está o hábito de ranger ou apertar os dentes, também denominado de bruxismo (Lavigne et al., 2001; 2008).

O bruxismo tem sido associado a comportamentos parafuncionais (Attanasio, 1991), causando a união forçada entre os dentes ou ao “ranger” dos dentes, ou uma combinação de ambos. A união forçada entre os dentes é o encerramento contundente da dentição oposta num relacionamento estático da mandíbula com a maxila em máxima intercuspidação ou posições excêntricas. Ranger os dentes é o encerramento contundente da dentição oposta com um relacionamento maxilo-mandibular dinâmico, uma vez que o arco mandibular se move através de várias posições excursivas (Attanasio, 1997).

O bruxismo pode ocorrer durante o dia ou durante a noite. O bruxismo durante o sono ocorre principalmente durante a fase REM (“Rapid Eye Movement”) (Bell, 1990). A associação americana de distúrbios do sono define bruxismo como um distúrbio do movimento, estereotipado, periódico, do sistema mastigatório envolvendo ranger dos dentes ou a sua união forçada durante o sono (Sari e Sonmez, 2001).

O “ranger dos dentes” tem sido associado a *stress* por tensão psíquica. No princípio do século XX, Karolyi sugeriu outro factor importante para o bruxismo oclusal: a desarmonia oclusal (Silva e Cantisano, 2009).

Mas a tensão psíquica e a desarmonia oclusal por si só não são capazes de originar bruxismo. Reflexos nociceptivos deveriam normalmente evitar as interferências oclusais durante os movimentos mandibulares, formando arcos reflexos modificados. No entanto, no bruxismo, as interferências oclusais são procuradas para contactos de bruxismo, contactos estes muito mais fortes do que os efectuados durante a mastigação, devido a uma falha no sistema de reflexo da dor. É exatamente a este nível que persistem grandes dúvidas entre os autores. Na verdade, não se sabe se a falha do sistema nociceptivo é devida a uma ordem central ou se é devida a um aumento do limiar de excitação dos receptores.

A etiologia do bruxismo é multifatorial. A relação íntima entre a tensão psíquica e o bruxismo tem sido lógica para a maioria dos investigadores. Slavicek (2006) afirma que o ranger dos dentes funciona como uma “válvula de escape” do *stress* através do aparelho estomatognático.

Na verdade, devemos olhar para os fatores etiológicos combinados, por exemplo, fatores psicológicos e dentários (oclusais); no fundo, a combinação de fatores somáticos e fatores psicológicos (Cash, 1988).

Os indivíduos com comportamentos neuróticos tendem a relatar mais queixas somáticas em geral (Costa e McCrae, 1987), incluindo queixas de saúde oral (estalidos articulares da ATM, dificuldade de mastigação dos alimentos e xerostomia).

O sistema estomatognático deve ser considerado como parte de um todo, e Janson em 1973, já acreditava que a oclusão não deve ser avaliada de *per si* devendo ser considerada como parte integrante de uma unidade funcional do organismo humano. Pelo que, no tratamento de pacientes, a meta final é estabelecer e manter uma relação bem equilibrada e harmoniosa deste sistema. O equilíbrio oclusal refere-se não só ao contacto físico dos dentes e seus efeitos sobre o periodonto, como também aos seus efeitos sobre a fisiologia do sistema neuromuscular e da ATM.

O ranger de dentes tem sido encarado como uma manifestação física do *stress* e ansiedade. Vários estudos provam que os indivíduos que rangem os dentes tendem a relatar mais sintomas de ansiedade e depressão do que não-bruxómanos (Manfredini et al., 2004; Gungormus e Erciyas, 2009).

Mesmo em ratos, submetidos experimentalmente a *stress* emocional, verificam-se mais sintomas como os de bruxismo, em comparação com os controlos (Rosales et al., 2002). As consequências do bruxismo crónico são muitas, desde queixas ao nível da articulação temporo-mandibular (Glaros et al., 1998; Branco et al., 2008), dor facial e perturbação do sono do parceiro(a), desgaste do esmalte dentário atingindo por vezes outras camadas do dente, como a dentina e a polpa, sensibilidade dentária e até perda do dente.

O bruxismo parece ser mais grave durante os períodos de maior *stress* e ansiedade. Embora a maioria das pesquisas se centre na depressão e ansiedade aguda, há algumas evidências de que a ansiedade somática e tensão muscular estão associadas com bruxismo crónico (Bader et al., 1997; Kampe et al., 1997).

Contudo, o bruxismo é o hábito parafuncional mais frequentemente implicado nas alterações dentárias por desgaste dos componentes mineralizados do dente, pelo que faremos uma revisão ao desgaste dentário.

DESGASTE DENTÁRIO

O desgaste dentário consiste na destruição irreversível das estruturas mineralizadas do dente. Tem uma etiologia multifatorial (Kelleher e Bishop, 1999). Muitos dos fatores etiológicos refletem as alterações e mudanças resultantes das situações causadoras de *stress* do estilo de vida moderno (Al-Zarea, 2012).

É um complexo processo biológico de perda de tecido duro do dente que pode afetar seriamente as funções de mastigação, discurso e aparência facial (Kovacevic e Belojevic, 2006).

Na literatura, nem sempre têm sido consensuais os critérios clínicos para os diferentes tipos de desgaste dentário, dificultando o seu diagnóstico diferencial.

O desgaste do dente pode resultar de três processos (Addy e Shellis, 2006): abrasão (desgaste produzido pela interação entre os dentes e outros materiais); atrito (desgaste através do contacto dente-a-dente) e erosão (dissolução do tecido duro por substâncias ácidas).

Como verificaremos adiante, estas definições de abrasão, atrito e erosão, que vulgarmente se usam, acabam por ser demasiado limitativas.

Um novo processo, a abfração, também deve ser considerado. A perda de substância mineralizada na região cervical do dente era atribuída à abrasão, erosão ou uma combinação das duas. Estudos como os de Rees e Jagger (2003) defendem que é muito relevante o papel da carga (força) oclusal para este outro tipo de desgaste, a abfração. Rees e Jagger (2003) acreditam que as intensas forças oclusais são capazes de causar grandes tensões cervicais, provocando uma rutura nos cristais de hidroxiapatite e eventual perda de esmalte na zona cervical do dente, dando origem à abfração ou, também denominada, lesão cervical não cariiosa.

Tanto a clínica como as observações experimentais mostram que os mecanismos de desgaste individuais raramente agem sozinhos, mas interagem uns com os outros. O desgaste é potenciado pela interação entre a abrasão e a erosão causando danos aos tecidos mineralizados do dente. Essa interação parece ser o principal fator de desgaste nas faces oclusais e no colo do dente (nomeadamente na região cervical dos dentes). Os estudos de Ommerborn *et al.*, (2007) mostraram que os indivíduos com hábitos de bruxismo apresentavam maior número de lesões de abfração do que os controlos.

A saliva desempenha um papel importante, podendo modular a ação erosiva/abrasiva sobre o dente através da formação de película e por remineralização, mas não pode impedir inteiramente o desgaste.

O desgaste dentário foi já incluído na Classificação Internacional de Doenças da WHO (2003).

Diz-se que o sinal objectivo mais confiável de hábitos parafuncionais é a abrasão oclusal e incisal nos dentes (Kovacevic e Belojevic, 2006). Nos estudos de Kovacevic e Belojevic (2006) num grupo de trabalhadores da indústria têxtil, concluiu-se que os dentes apresentavam significativo desgaste por abrasão e os autores admitem a existência de maior número de hábitos parafuncionais, como o bruxismo, nos referidos trabalhadores.

No entanto, o uso do desgaste oclusal como único marcador de abrasão tem sido criticado porque a magnitude do desgaste de um dente é afetada por muitos fatores, incluindo densidade do esmalte e qualidade da saliva (Lavigne et al., 2008), como teremos oportunidade de frisar mais adiante.

Dissociar o desgaste por abrasão de outras formas de desgaste dentário é uma tarefa difícil, não só porque a sua etiologia é multifatorial, como também porque os estudos revelam que as formas de desgaste potenciam-se umas às outras e raramente agem sozinhas (Vieira *et al.*, 2006). É fácil de compreender que, por exemplo, quando o esmalte do dente se encontra desgastado por erosão, a dentina fica exposta e, consequentemente, mais suscetível ao desgaste por abrasão ou atrito, pois a sua dureza é menor do que a do esmalte (Meredith *et al.*, 1996; Koczorowski e Wloch, 1999; Hooper *et al.*, 2003).

Petersen e Henmar (1988) mostraram que os trabalhadores numa indústria de granito na Dinamarca, expostos ao pó de quartzo, tinham uma prevalência de abrasão nos dentes anteriores de 100%. A gravidade e a extensão das lesões de abrasão aumentaram proporcionalmente com o tempo de exposição ao pó de quartzo. Também Prpić-Mehićić *et al.*, (1998) verificaram que 90% dos trabalhadores na indústria do vestuário apresentavam abrasão dos dentes incisivos por terem por hábito cortar fios com os dentes em vez de usarem a tesoura.

O hábito parafuncional de bruxismo é, inevitavelmente, uma forma de os dentes sofrerem forças de atrito pelo contacto forçado entre dentes antagonistas. Motivo pelo qual, alguns autores (Cengiz *et al.*, 2009) relatam a hipertrofia dos músculos mastigadores como sinal de alerta dos efeitos do bruxismo no desgaste dentário sob a forma de atrito.

Em síntese, o desgaste dentário é um processo multifatorial. Raramente se encontra um único tipo de desgaste. É uma condição irreversível. Os efeitos do desgaste dentário são geralmente progressivos, mas podem ter evolução lenta. Combinações de desgaste por atrito, erosão e abrasão são sinérgicos (Vieira *et al.*, 2006). Na prática clínica diária do Médico Dentista surgem pacientes com este problema. Os casos que observamos podem ir, desde pequenos desgastes oclusais/incisais, afetando apenas o esmalte do dente, e sem sintomatologia; a casos de hipersensibilidade dentinária; ou até de exposições pulpares; patologias da ATM; diminuição da dimensão vertical, afetando a estética do 1/3 inferior da face; e casos em que o paciente se confessa muito afetado sob o ponto de vista psicológico. O diagnóstico precoce, a prevenção e a intervenção são as chaves essenciais ao nosso alcance para minimizar os efeitos deste problema.

Como referimos, o dente reflete muitas vezes os desequilíbrios do sistema estomatognático e a literatura mostra que mesmo os estímulos superficiais e/ou exteriores podem repercutir-se em alterações na estrutura interna do órgão dentário através do complexo pulpo-dentinário.

II - OBJECTIVOS

Este trabalho tem por objectivos a identificação e caracterização morfológica dos efeitos do ruído industrial sobre o dente ao longo do tempo, nomeadamente:

- Avaliar e caracterizar a evolução do desgaste nas coroas dos molares, em função do tempo de exposição ao ruído industrial.
- Identificar e caracterizar as alterações ultraestruturais da dentina circumpulpar.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

Modelo Animal

O estudo foi conduzido usando 40 ratos Wistar adultos, com igual número de machos e fêmeas, adquiridos ao laboratório Charles River, Barcelona, Espanha.

Os animais foram colocados em gaiolas, onde podiam movimentar-se livremente, em grupos de dois, de um só género. Foram alimentados com ração “standard” para roedores e tiveram livre acesso a água. Mantiveram-se ciclos diários com 12 horas de luz e 12 horas de escuridão.

Foram tratados de acordo com a diretiva da União Europeia para proteção aos animais utilizados para estudos científicos e experimentais (86/609/EEC, substituída pela 2010/63/EU), e de acordo com a transposição para a legislação Portuguesa para os mesmos efeitos (Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro).

Protocolo Experimental

Exposição ao Ruído Industrial

Num compartimento isolado medindo 302x308x290 cm, as gaiolas (42x27x16 cm) com os animais foram colocadas em prateleiras (figura 13).

Os animais foram expostos ao ruído industrial durante 1 a 7 meses, em diferentes períodos de tempo, de forma a simular o horário laboral normal (8 horas/dia, 5 dias/semana com os fins-de-semana em silêncio). 30 animais foram divididos em três grupos de 10 animais cada e sacrificados após 1, 4 e 7 meses de exposição ao ruído. Os restantes 10 animais foram mantidos em silêncio para controlo e sacrificados com as mesmas idades dos animais dos grupos expostos.

O ruído de uma fábrica têxtil do norte de Portugal foi usado para simular o ambiente ocupacional a que os operários estão submetidos. O ruído presente no local de trabalho foi gravado e reproduzido usando um conjunto eletroacústico baseado num sistema de computador, com uma placa de aquisição de dados DT2823 e cartão SB Live 5.1, um microfone B&K 4165 com pré-amplificador, um amplificador de 2 canais, um “subwoofer” e 16 altifalantes tipo monitor (figura 13). O software foi concebido usando o sistema LabVIEW. O processamento de sinais de som foi feito off-line, aplicando os sistemas LabVIEW e Matlab (Oliveira *et al.*, 2005). A caracterização das frequências e amplitude

dos sinais foi efectuada em todas as amostras. O espectro de frequências e intensidades está documentado no gráfico da figura 14.

A pressão sonora média na sala e a dispersão de valores entre as gaiolas foram cuidadosamente controladas.

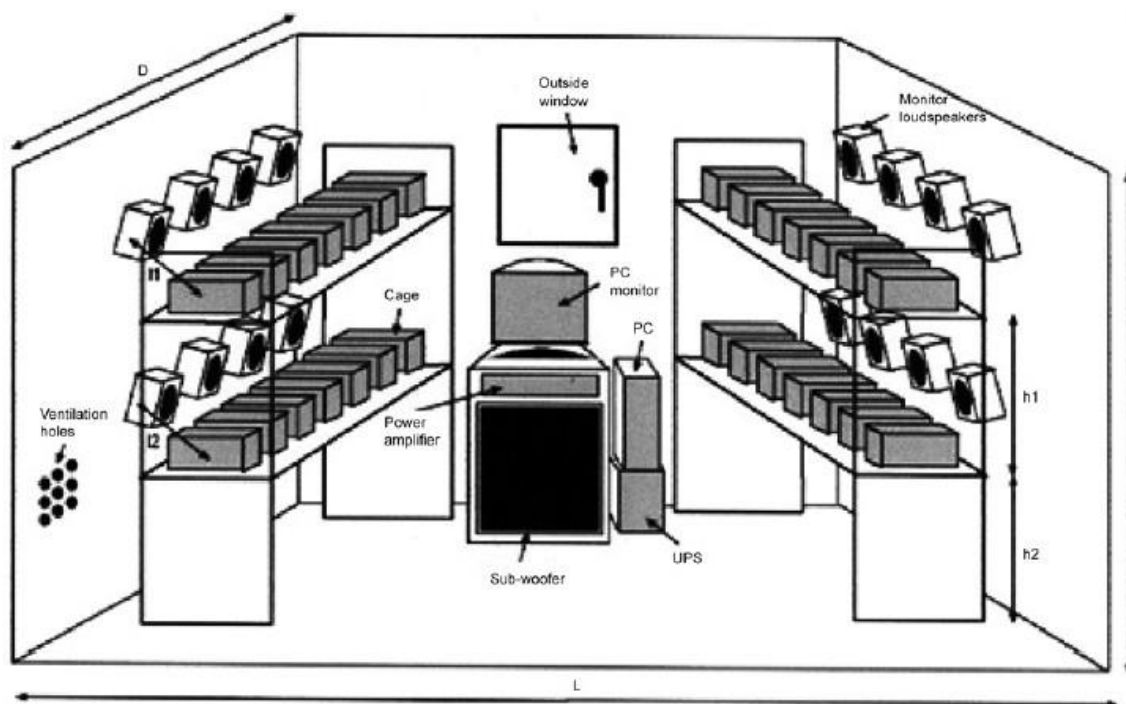


Figura 13 – Esquema representativo da organização espacial da sala onde os animais foram expostos ao ruído industrial. L=3,02m; D=3,08m; H=2,90m. (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2005).

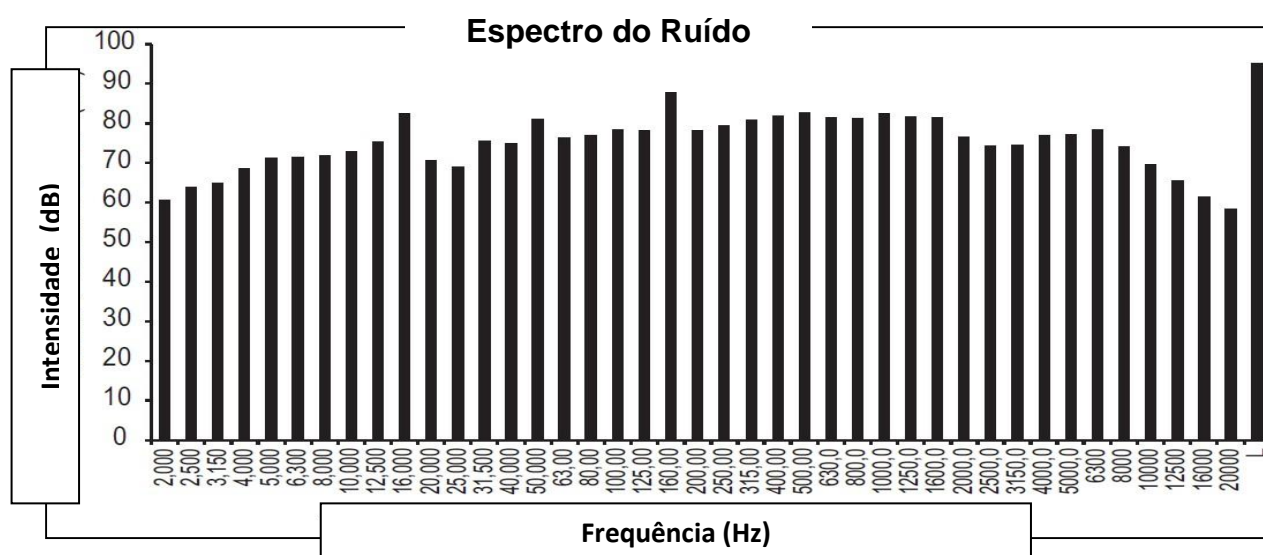


Figura 14 – Espectro de distribuição das frequências e intensidades gravadas e reproduzidas no ambiente ao qual foram expostos os animais (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2005).

Os animais foram divididos em 4 grupos com igual número de género e, com exceção do grupo de controlo, foram expostos ao ruído industrial, durante períodos variáveis de exposição crescente (Tabela 1):

Grupo	Número de animais	Horas de exposição ao ruído industrial
g Controlo	10	0 horas (silêncio)
g 1 mês	10	160 horas
g 4 meses	10	640 horas
g 7 meses	10	1120 horas

Tabela 1 – Tempo de exposição total ao RBF para cada grupo (em horas).

Após os tempos de exposição, os animais foram sacrificados com uma injeção intraperitoneal de Ketamina (Ketalar, Parke-Davis Co., Barcelona, Spain; 4,0-8,0 mg/Kg peso).

Macroscopia

As arcadas dentárias de todos os animais foram cuidadosamente observadas. Fotografámos a arcada dentária superior e inferior de todos os animais de cada grupo.

Extraímos oito dentes por animal, sendo quatro superiores e quatro inferiores. Recolhemos, de cada animal, dois molares esquerdos e dois direitos; os dentes extraídos foram os primeiros e os segundos molares (figura 15).

A extração dos dentes molares foi feita de acordo com os princípios cirúrgicos aplicados em Medicina Dentária. Usámos um sindesmótomo nº 295-3 (ASA DENTAL) e aplicámos forças muito suaves para a luxação dos dentes tendo em conta a sua pequena dimensão e a fragilidade das raízes.

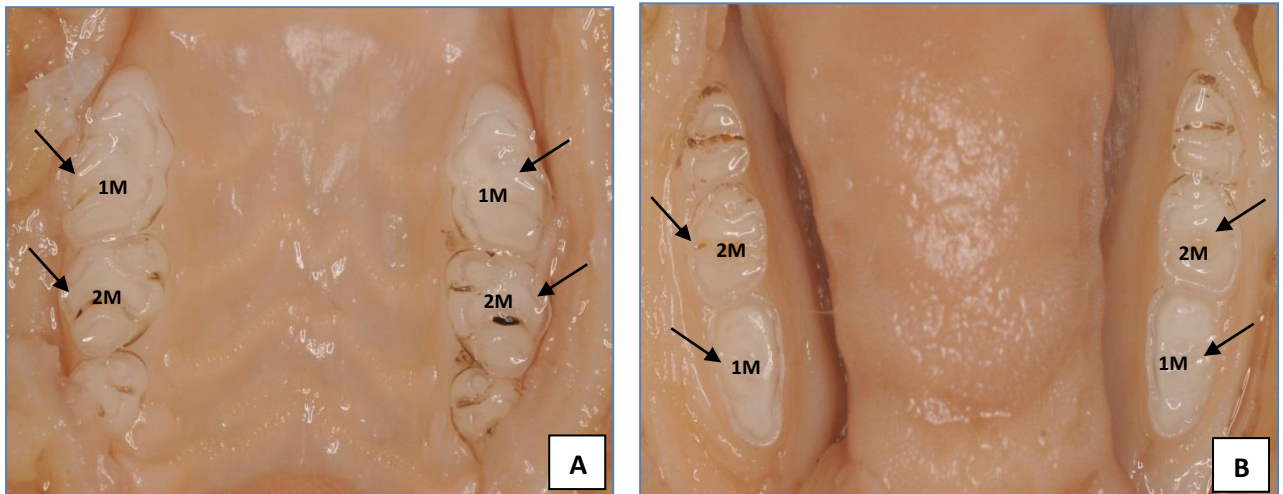


Figura 15 - Arcadas dentárias do rato Wistar. A) Arcada dentária superior; B) Arcada dentária inferior. As setas assinalam os dentes extraídos. 1M= primeiro molar; 2M= segundo molar.

Microscopia

Metade dos dentes foi fixada em formol tamponado a 10% para observação em microscopia ótica. Os restantes foram conservados em Gafaca para microscopia electrónica.

Microscopia Ótica

Os fragmentos fixados em formol a 10% foram descalcificados em ácido nítrico a 10% durante 48h. Após o processamento completo, os dentes foram incluídos, cortados longitudinalmente, no sentido mesio-distal, e corados com a coloração de Hematoxilina e Eosina.

Morfometria

Os cortes histológicos foram observados com uma ampliação de 40x utilizando um microscópio Leica DM LB (CMS Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha).

A análise das imagens foi realizada com o software LAS (Leica Application Suite).

Foi medida a área das três cúspides principais de cada dente: cúspide mesial, cúspide central e cúspide distal.

Medimos a área de cada cúspide traçando uma linha no seu contorno, seguindo a superfície oclusal e unindo a linha tangente ao ponto mais alto do corno pulpar (figura 16). Foram excluídas as cúspides que tinham contorno pouco claro ou destruído.

Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo observador. Cada medição cega foi repetida três vezes, em três dias diferentes, e a média foi calculada e utilizada para a análise estatística dos dados.

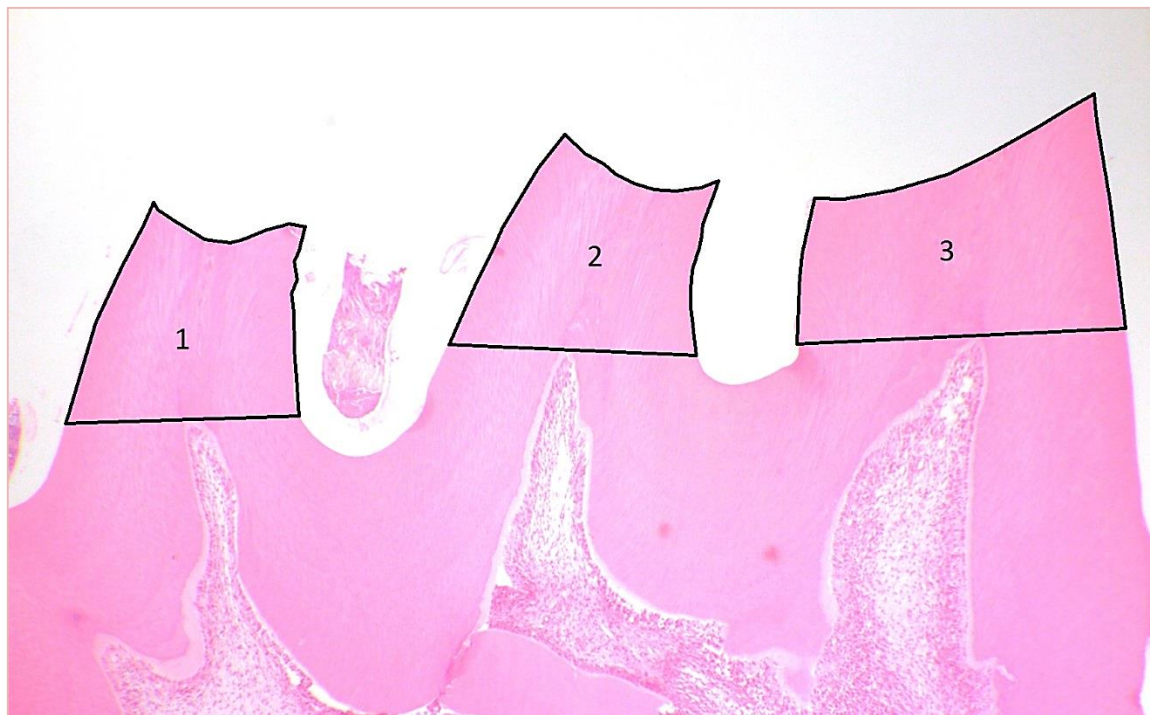


Figura 16 – Procedimentos de medição das áreas das cúspides. 1- cúspide distal; 2-cúspide central; 3-cúspide mesial. HE, 40x

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software SPSS 19.0. Todos os testes estatísticos foram aplicados ao nível de significância de 5%.

Um modelo de análise de variância de duas vias foi ajustado aos dados depois de verificar os pressupostos do modelo, em que a variável dependente foi definida como a média das áreas das três cúspides. Os dois fatores independentes foram tempo (1, 4 e 7 meses) e grupo (exposto e controle). A suposição de homogeneidade de variância foi verificada pelo teste de Levene. No que diz respeito à normalidade de distribuição da variável dependente, e devido ao pequeno tamanho das classes, era suficiente para confirmar a simetria da variável, tal como o rácio F é robusto em tais condições.

Microscopia Electrónica de Varrimento por Emissão de Campo (FESEM) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Para a Microscopia Electrónica de Varrimento (FESEM), as amostras foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e fixadas à temperatura ambiente numa solução composta por 4% de formaldeído, 1,25% de glutaraldeído e 10 nmol/L CaCl_2 em 0,05 mol/L de cacodilato tamponado (Águas *et al.*, 1991).

Os dentes foram fracturados longitudinalmente (no sentido mesio-distal), de modo a expor a dentina circumpulpar (figura 17), usando uma lâmina de barbear (Perdigão *et al.*, 1995).

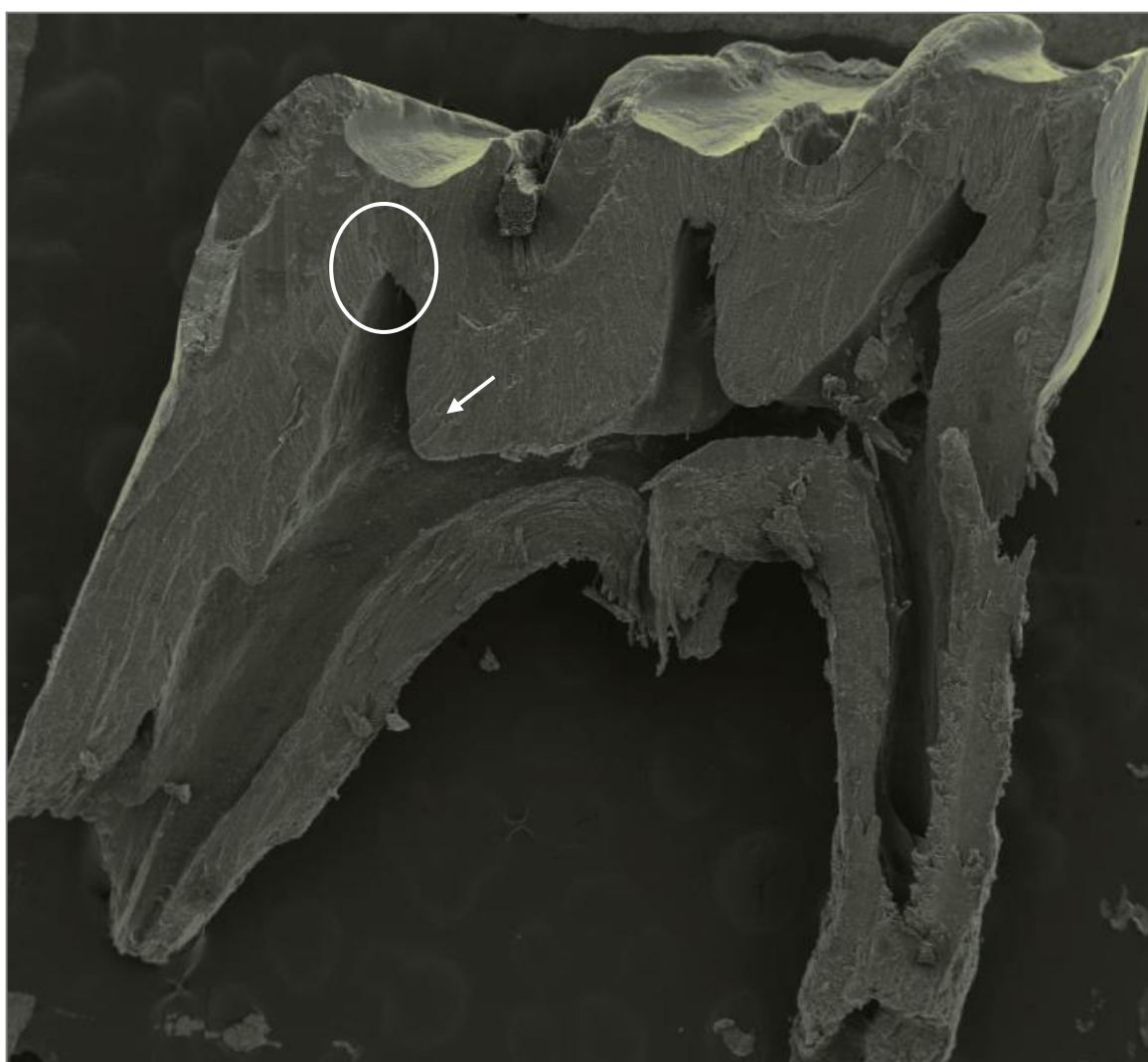


Figura 17 – Dente fracturado longitudinalmente, expondo a dentina e a área correspondente à polpa. Círculo = corno pulpar e dentina circumpulpar; seta = dentina circumpulpar no tecto da câmara pulpar.

Das duas metades do dente, uma foi sujeita a desproteinização e a outra não.

Os espécimes que foram desproteinizados, foram imersos em 2100 U de collagenase, *Clostridium histolyticum* (Type II-S, C1764, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em 0,05M trometamol (TRIS) e 0,01 M durante 1 mês, com mudança da collagenase de 2 em 2 dias.

Em todas as amostras (desproteinizadas e não desproteinizadas), procedemos à desidratação dos espécimes, segundo o método usado por Perdigão *et al.* (1995), i.e., com concentrações crescentes de etanol. As amostras foram secas até alcançarmos o ponto crítico usando HMDS (hexametildisilazina) (Perdigão *et al.*, 1995).

Procedemos em seguida, à observação das amostras por FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) e à análise elementar por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy).

As amostras foram observadas com um microscópio JEOL JSM-7001F (Field Emission Scanning Electron Microscope).

Nas amostras analisadas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), fizemos a leitura num ponto da dentina (figura 18) e a leitura num ponto da estrutura em forma de banda presente na interface dentina-polpa (figura 19).

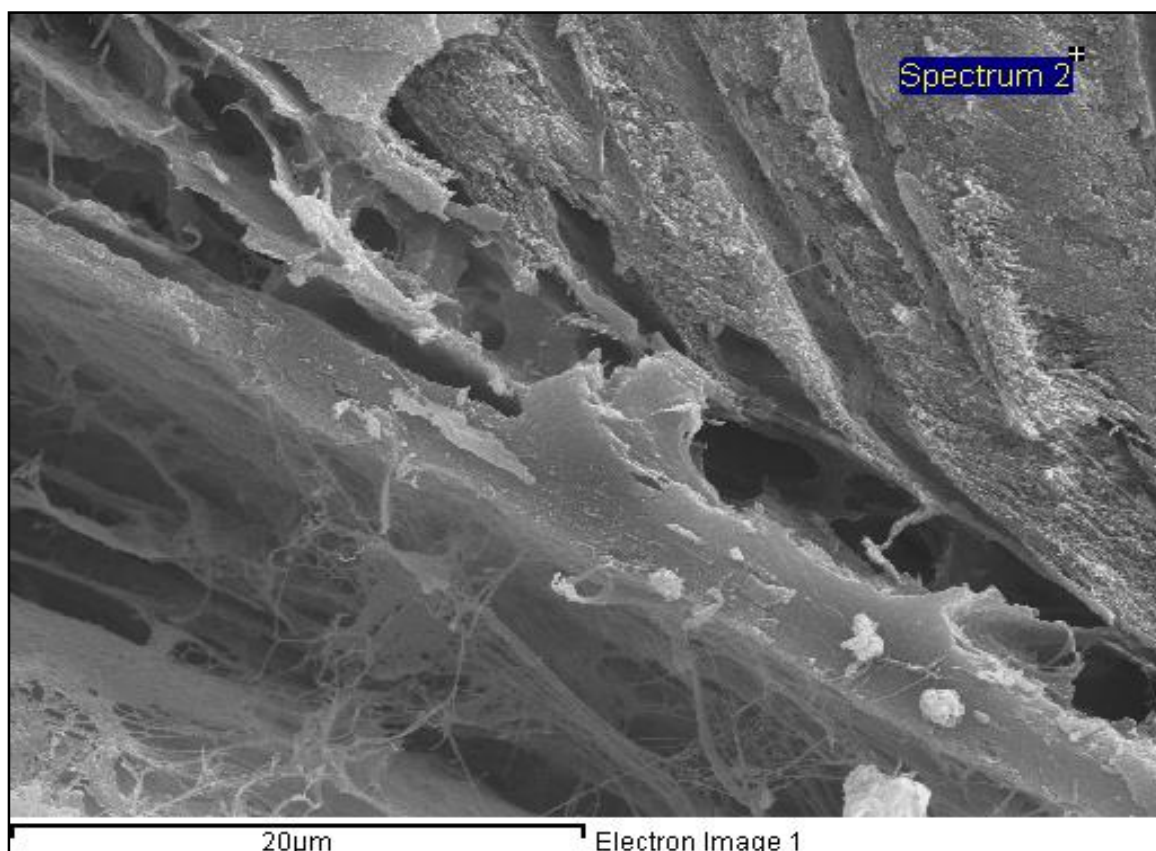


Figura 18 – Imagem da parede do corno pulpar. A análise elementar por espectroscopia foi realizada obtendo a leitura dos elementos químicos num ponto da dentina (spectrum 2).



Figura 19 – Imagem da parede do corno pulpar. A análise elementar por espectroscopia foi realizada obtendo a leitura dos elementos químicos num ponto da estrutura em forma de banda presente na interface dentina-polpa (spectrum 1).

Immunogold

Para estudarmos o colagénio, procedemos à marcação, por partículas de ouro, das fibras de colagénio do tipo I na dentina circumpulpar.

Os dentes estiveram numa solução tampão de fosfato. Como referido anteriormente, os dentes foram fraturados em duas metades (longitudinalmente, no sentido mesio-distal), para expor a dentina circumpulpar. As amostras foram lavadas em água destilada.

O protocolo de imunohistoquímica que seguimos (Breschi *et al.*, 2003a, 2003b) foi aplicado anteriormente a dentes humanos, pelo que precisámos de adequá-lo às nossas amostras de dente de rato.

Assim, iniciámos o processo de DESMINERALIZAÇÃO fazendo testes piloto, usando 3 soluções distintas. Dividimos as amostras em três grupos:

- a) EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic Acid) durante 30 minutos;
- b) Ácido cítrico (1g em 10ml de água destilada, pH 2) durante 15 segundos (4 amostras);
- c) Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 10% durante 15 segundos (6 amostras).

Após a desmineralização, lavámos todas as amostras com água destilada por 2 períodos de 5 minutos cada.

De seguida, lavámos com a solução tampão: TBS (Tris Buffer Solution) 0,05M pH 7,6 por 3 períodos de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Após este procedimento, iniciámos a PRÉ-INCUBAÇÃO:

-Primeiro preparámos o soro neutro (Neutral Goat Serum: NGS) diluído 1:20 numa solução de TBS de pH 7,6; molhámos uma placa horizontal, colocámos uma película por cima, sobre a qual depositámos as gotas onde mergulhámos cada uma das amostras, durante 30 minutos à temperatura ambiente, com exceção das que não tinham anticorpo (Ab).

Depois a INCUBAÇÃO, que aconteceu durante a noite:

-Primary antibody (IgG anti - Coll I – Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) - colocámos o anticorpo numa solução de NGS (Neutral Goat Serum) mais diluída do que a anterior, i.e. 1:40 e TBS 7,6;

Para os controlos, colocámos a solução de TBS e NGS (1:40), mas sem o anticorpo.

Após a preparação destas soluções, retirámos as amostras da placa onde estiveram na solução de NGS durante 30 minutos, secámo-las um pouco e preparámos placas de petri com filtro embebido em água destilada, coberto pela película com a identificação das amostras, colocámos uma gota da solução com Ab em cada local e mergulhámos as amostras nessa gota para permanecerem durante toda a noite em câmara húmida a 4°C.

Retirámos as soluções tampão (TBS 0,05M 7,6; TBS 0,02M 8,2) que preparámos no dia anterior e que retirámos do frigorífico meia hora antes, para que ficassem à temperatura ambiente.

Preparámos uma base retangular, humedecemos-a com água (para melhorar a aderência da película) e colocámos uma película (Para-film) sobre a mesma.

Sobre a película colocámos as gotas de TBS 0,05M pH 7,6 e mergulhámos as amostras por 3 períodos de 5 minutos cada.

De seguida, usámos o mesmo procedimento com TBS 0,02M pH 8,2 (3 períodos de 5 minutos cada).

O passo seguinte foi a incubação do anticorpo secundário (IgG goat anti-rabbit IGG conjugado com 15 nm de *gold* nanopartículas – British BioCell International). O anticorpo foi centrifugado durante 40 segundos antes de o adicionarmos à solução.

As amostras permaneceram 1h e 30 minutos, à temperatura ambiente e no escuro (pelo que foram tapadas com uma caixa de modo a não deixar passar a luz).

Após o procedimento anterior, as amostras foram lavadas com TBS pH 8,2 por 3 períodos de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Seguidamente, as amostras foram lavadas em água, por 2 períodos de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Passámos ao processo de FIXAÇÃO das amostras:

- Colocámos as amostras na solução de gluta 2,5% em Cacodilato pH 7,4, durante 2 horas, à temperatura ambiente.

De seguida, lavámos com Cacodilato 0,1M pH 7,4, por 3 períodos de 5 minutos cada.

Seguiu-se o processo de DESIDRATAÇÃO de acordo com o seguinte protocolo:

- 50% etanol – 2 períodos de 10 minutos cada;
- 70% etanol – 2 períodos de 10 minutos cada;
- 90% etanol – 2 períodos de 10 minutos cada;
- 100% etanol – 2 períodos de 10 minutos cada;
- Sem remover o etanol anterior, adicionámos 5 gotas de HMDS (Hexamethyldisilazane – Sigma Chemical Co.) 50% + 50% etanol durante 5 minutos;
- Removemos totalmente a solução anterior e adicionámos HMDS de forma progressiva aumentando gradualmente a concentração do mesmo:
- 50% HMDS + 50% etanol durante 10 minutos;
- Sem remover a solução, adicionamos 5 gotas de HMDS PURO durante 5 minutos;
- Removemos a solução anterior com o HMDS e colocámos HMDS puro durante 10 minutos.

Terminado o procedimento de imunohistoquímica, as amostras foram montadas nos “stubs” de cobre, que foram colocados no vácuo durante 30 minutos e, em seguida, fizemos a evaporação e deposição do carbono (coating).

As amostras foram observadas num microscópio Jeol (JSM – 890 Scanning Microscope) com uma voltagem de 7,0 Kv.

IV – RESULTADOS

Resultados Macroscópicos

A observação macroscópica dos dentes dos ratos Wistar permitiu identificar desgaste dentário nas superfícies oclusais dos molares, em todos os grupos submetidos ao ruído industrial.

Foi possível observar que o desgaste dentário afecta todos os molares presentes na arcada dentária (figura 20).

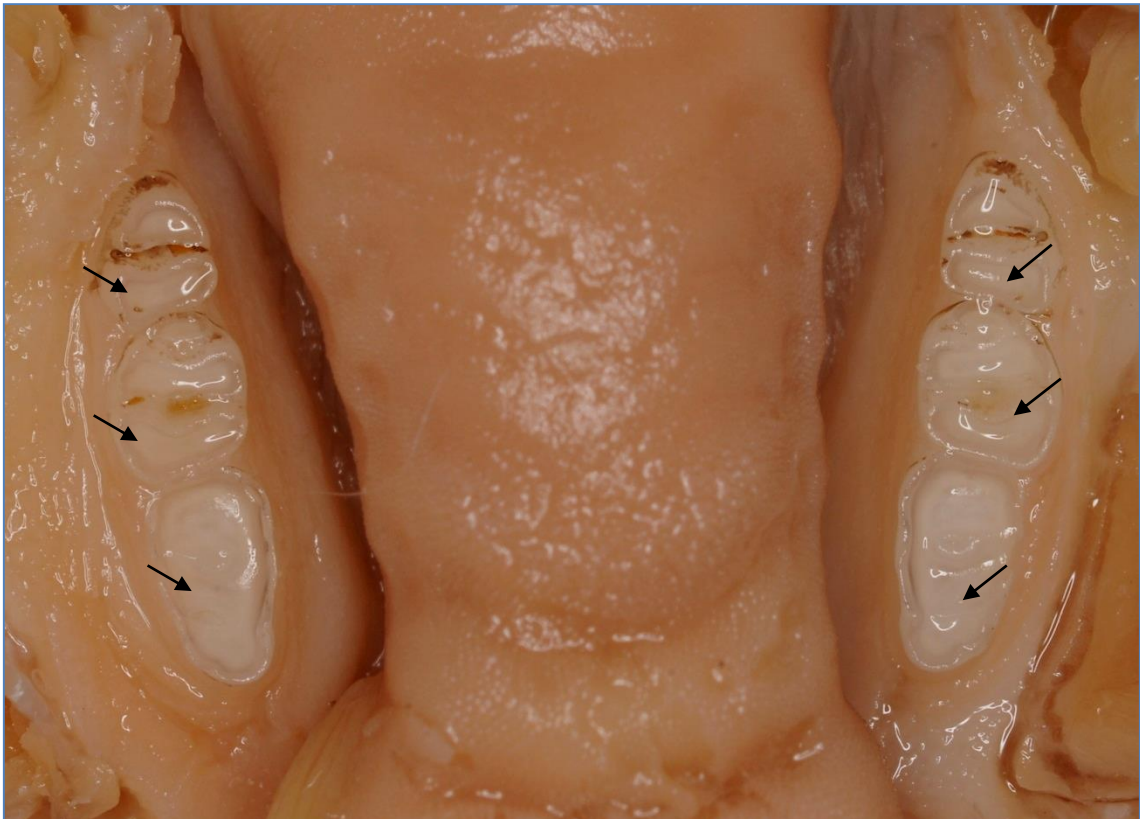


Figura 20 – Arcada dentária inferior do rato Wistar aos 4 meses de exposição ao ruído. Observam-se todos os molares afectados pelo desgaste dentário nas superfícies oclusais (setas).

No grupo de controlo de 1 mês, as superfícies oclusais dos molares parecem estar ainda poupadas pelo desgaste (figura 21).

Aos 4 meses de exposição ao ruído, o desgaste oclusal nos molares é já bem visível macroscopicamente. E, como podemos observar na figura 22, todas as cúspides são afectadas.



Figura 21 – Primeiro molar inferior do rato Wistar pertencente ao grupo de controlo (1 mês), sem evidências de desgaste oclusal.



Figura 22 – Primeiro molar inferior do rato Wistar pertencente ao grupo exposto de 4 meses, onde se pode observar o desgaste afectando todas as cúspides.

Resultados Histológicos

A observação dos dentes molares em microscopia ótica permitiu comprovar o maior desgaste nas cúspides dos molares expostos ao ruído industrial (figura 23) comparativamente com os molares dos grupos de controle.

Foi observada dentina globular na maioria dos dentes estudados, tanto nos grupos de controle como nos grupos expostos (figura 23).

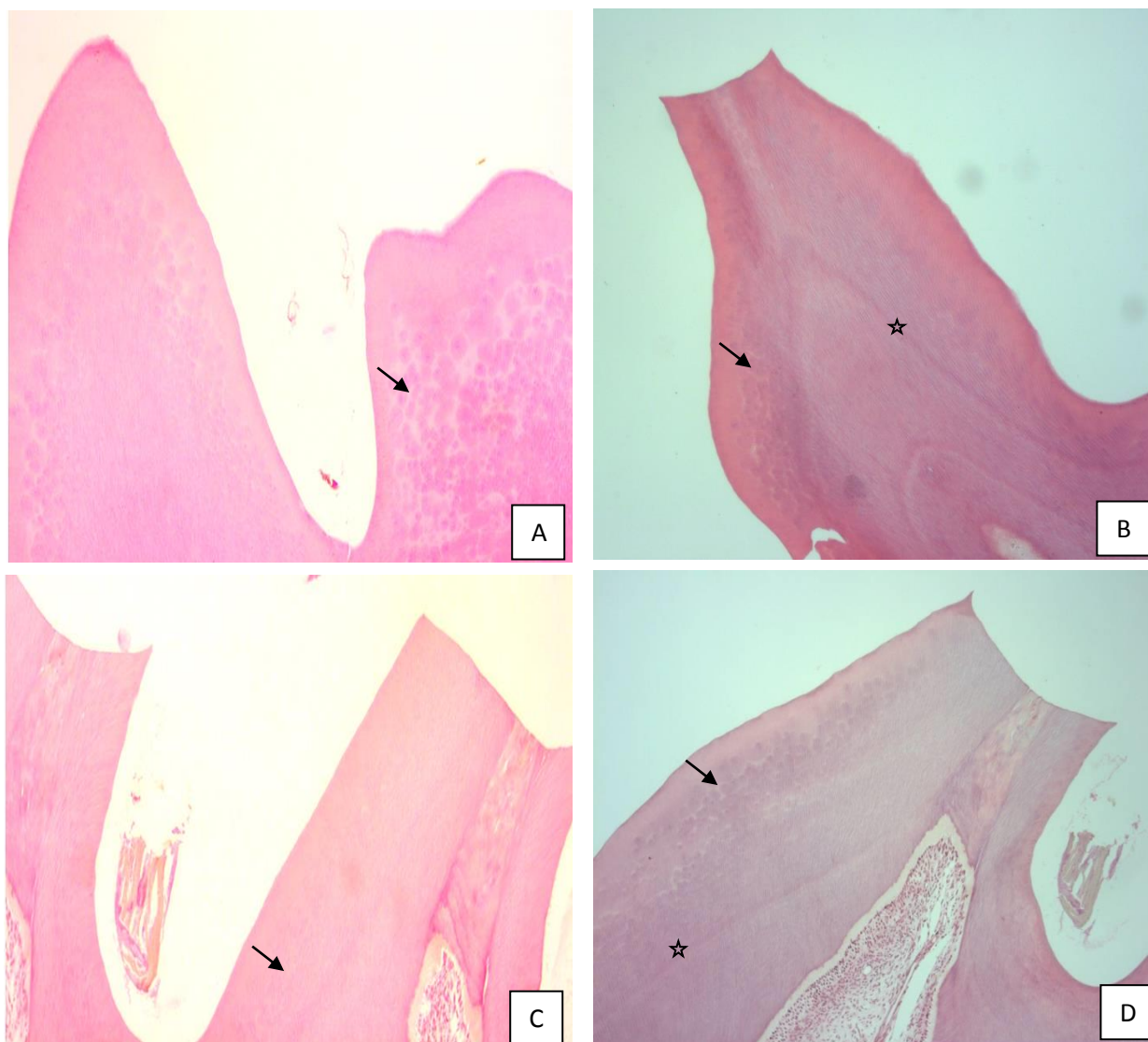


Figura 23 – Imagens de microscopia ótica onde se observam cúspides do molar do rato Wistar: A – Grupo de controle (1 mês); B – Grupo de controle 4 meses; C – Grupo 1 mês de exposição; D – Grupo 4 meses de exposição. Note-se que o desgaste nas cúspides é notoriamente maior nos grupos expostos ao ruído industrial (C e D) do que nos grupos de controle correspondentes (A e B). Note-se a presença de dentina globular em todos os grupos (seta). Na imagem B e D estão bem visíveis as linhas incrementais da dentina (estrela). HE, 40X.

Os cortes histológicos permitiram observar as linhas incrementais da dentina (figura 23 B e D).

As imagens de microscopia ótica permitiram observar a disposição dos odontoblastos na porção coronária (figura 24) e radicular da polpa (figura 25).

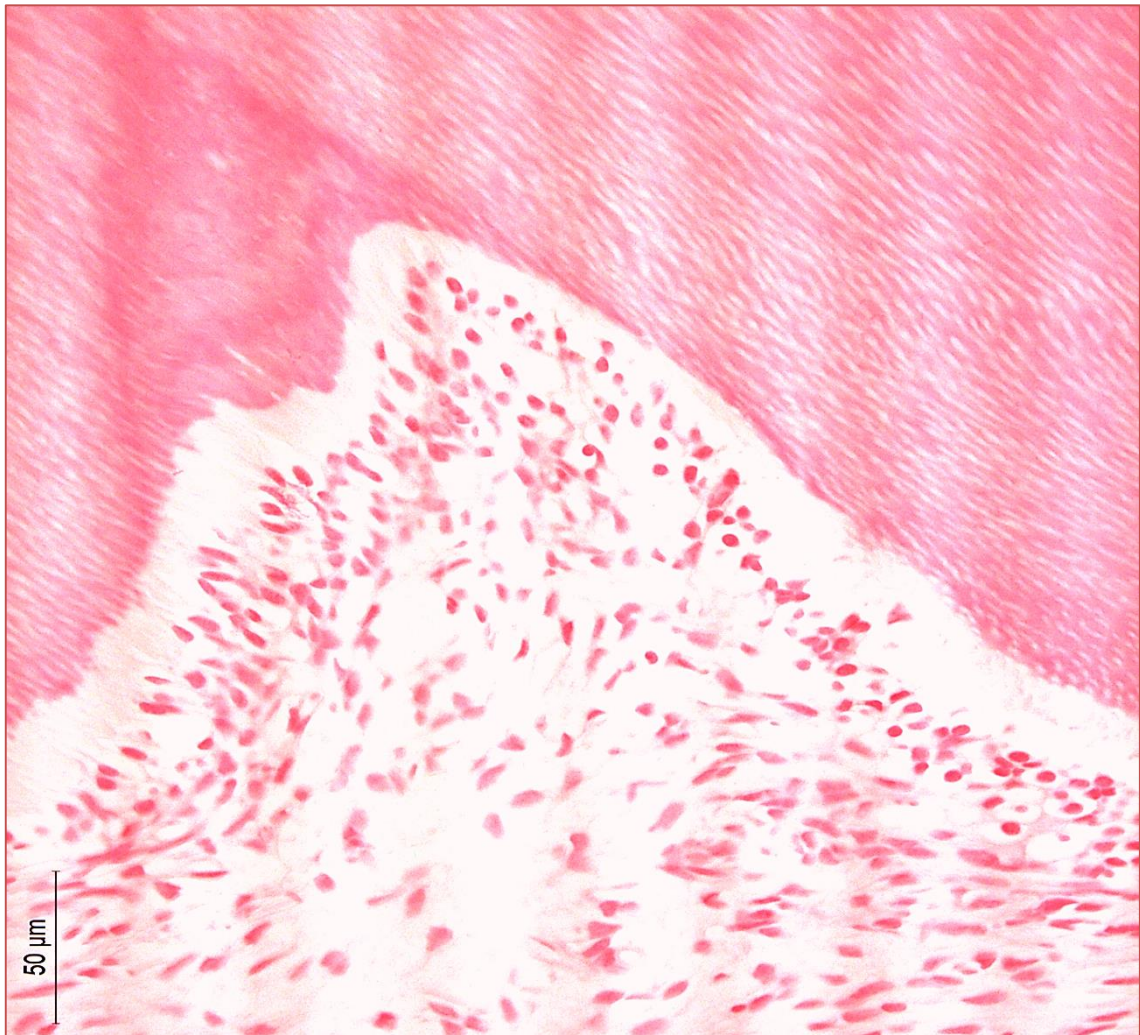


Figura 24 – Corte histológico onde é possível observar as células na porção coronária da polpa no molar do rato Wistar. HE, 40X.

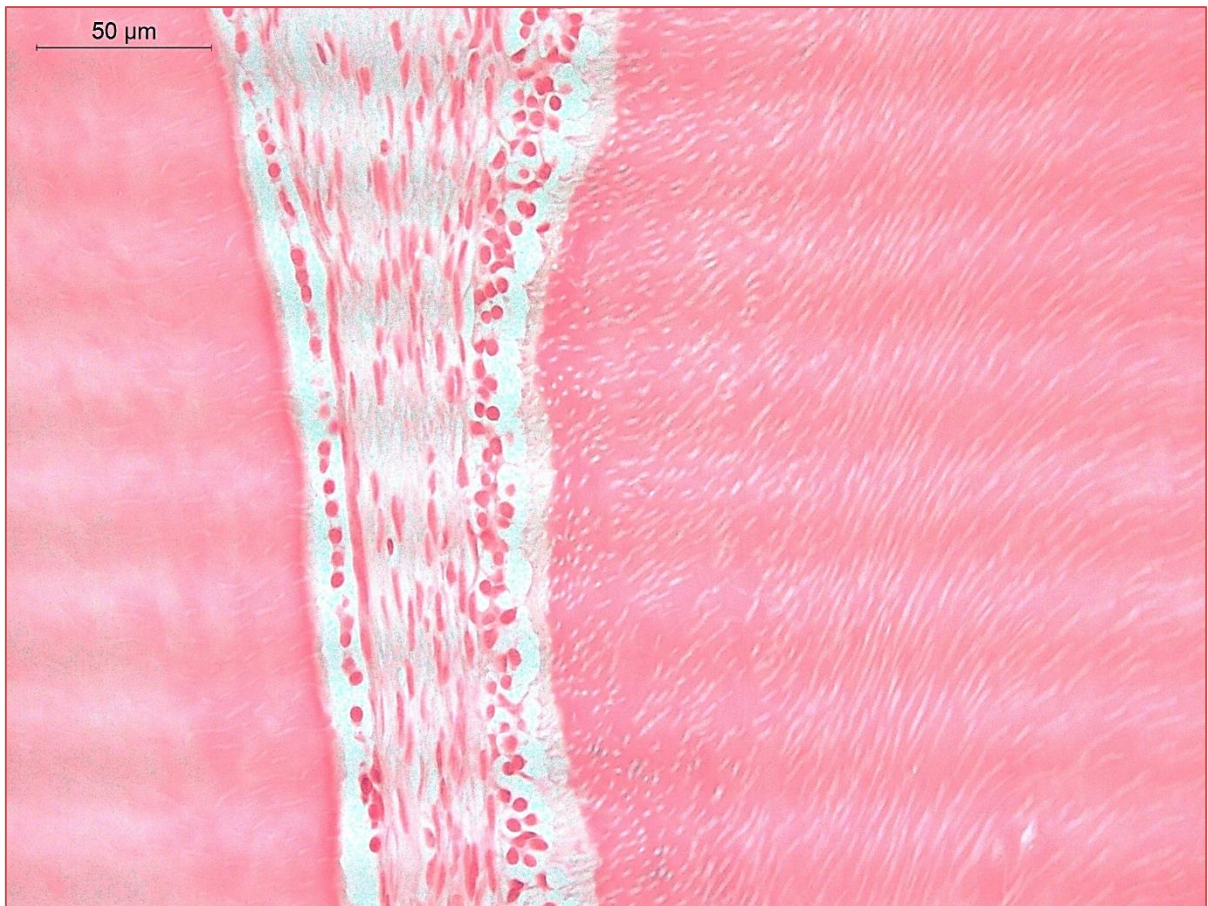


Figura 25 – Corte histológico onde é possível observar as células na porção radicular da polpa no molar do rato Wistar. HE, 40X.

Nos grupos de controle, o desgaste parece ocorrer apenas em função do aumento da idade dos animais (figura 26 e figura 27).

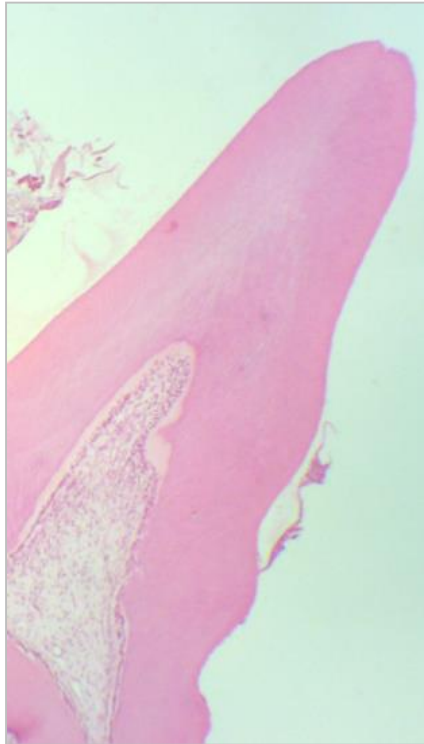


Figura 26 – Cúspide distal de um molar do grupo de controle (1 mês) sem evidentes sinais de desgaste. H-E, 40x.

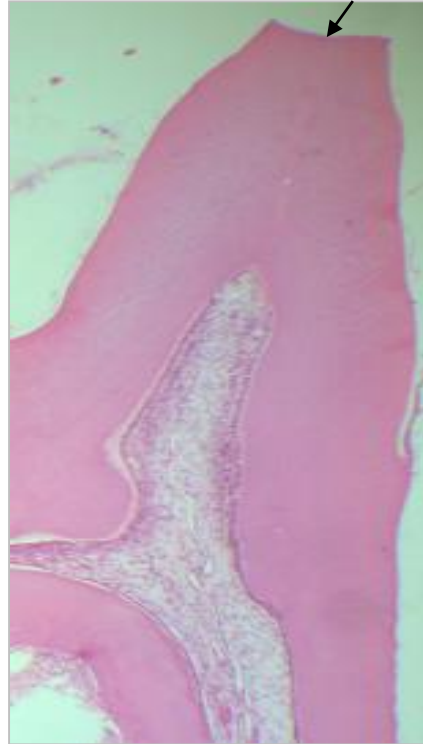


Figura 27 – Cúspide distal de um molar do grupo de controle aos 7 meses, apresentando discreto desgaste oclusal (seta). H-E, 40x).

Morfometria

Os cortes histológicos mostraram diferenças entre as cúspides dos molares submetidos ao ruído e as cúspides dos molares dos grupos de controle.

As imagens histológicas dos grupos de controle ao 1 mês mostraram as cúspides sem sinais de desgaste (figura 26).

Nos cortes histológicos dos molares dos grupos submetidos ao ruído industrial, observou-se desgaste dentário em todos os grupos, isto é, o desgaste comprovou-se aos 1 (figura 23 C), 4 (figura 23 D) e 7 meses.

A tabela 2 apresenta os resultados da ANOVA two-way para a área média das 3 cúspides do molar. Com base nestes resultados, é possível afirmar que a área média das cúspides difere significativamente entre animais expostos e não expostos ao ruído.

Podemos também constatar que essa área média varia significativamente com o tempo.

Tabela 2. Testes dos efeitos entre as variáveis

Variável dependente: área media			
Efeito	F	Sig.	Potência observada ^b
Tempo	25,561	< 0,001	1,000
Grupo	59,703	< 0,001	1,000
Tempo * Grupo	9,111	< 0,001	0,969

a. R Squared = 0,694 (Adjusted R Squared = 0,668)

b. Computed using alpha = 0,05

A magnitude das variações e a significância estatística dos contrastes permitem concluir que as diferenças mais marcantes entre os grupos no que respeita às taxas de variação da área média das cúspides do molar observam-se entre o mês 1 e o mês 4.

No que se refere ao efeito interactivo, os testes planeados permitem estabelecer que, ao mês 1, a área total das cúspides de ambos os dentes não difere significativamente entre os animais expostos e não expostos ($p = 0,626$), enquanto aos meses 4 e 7, a área total das cúspides é significativamente menor nos animais expostos do que nos animais não expostos ($p < 0,001$).

Na tabela 3, mostram-se os valores totais do desgaste das coroas desde o primeiro ao sétimo mês.

Nos grupos de controlo, a perda total da coroa desde o primeiro ao sétimo mês foi de 17,3%. Nos grupos expostos, a perda total da coroa desde o primeiro ao sétimo mês foi de 46,5% e estas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Sendo que, entre o primeiro e o quarto mês, ocorre o desgaste mais severo (39,2%), como se observa na tabela 3

Tabela 3. Área média das cúspides Variável Dependente: área média					
Tempo	Grupo	Média ^a	Erro padrão	Variação dentro do grupo (%) ^b	
1	Controlo	250662,861	11258,752	-	-
	Exposto	235052,165 ($p = 0,331$)	11258,752	-	-
4	Controlo	251476,163	11258,752	+0,3	-
	Exposto	142855,392 ($p < 0,001$)	11258,752	- 39,2 ($p < 0,001$)	-
7	Controlo	207392,995	10277,787	-17,3	-17,5
	Exposto	125712,686 ($p < 0,001$)	9874,579	-46,5 ($p < 0,001$)	-12,0 ($p = 0,212$)

^a Significância (p) efeitos interactivos.

^b Significância(p) contrastes planeados.

Área total das cúspides

Os resultados da ANOVA two-way para a área média de todas as cúspides de ambos os dentes mostram que a área média difere significativamente entre animais expostos e não expostos ao ruído, que a mesma área média varia significativamente com o tempo e que essa variação ocorre de forma significativamente diferente nos dois grupos. O gráfico 1 representa os valores médios estimados para a área média nas classes definidas pelos factores principais.

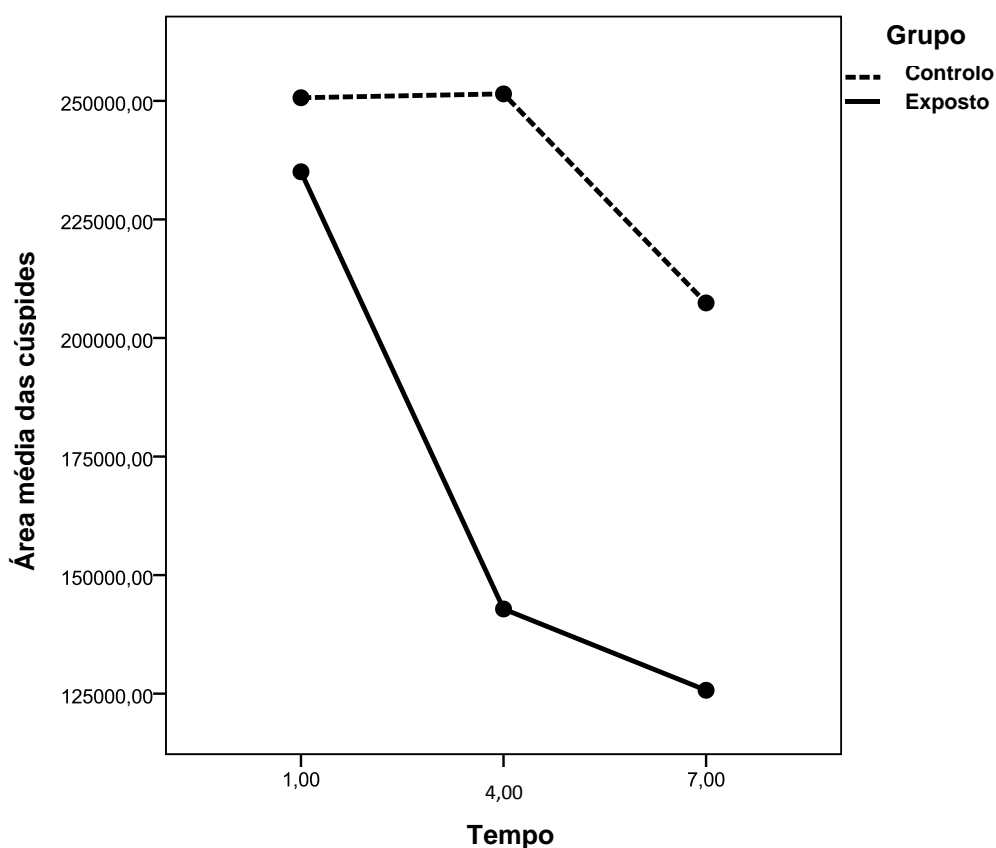


Gráfico 1 – Valores médios estimados para a área média das cúspides dos animais dos grupos de controlo (linha tracejada) e dos animais dos grupos expostos ao ruído industrial (linha contínua), aos 1, 4 e 7 meses. Note-se que o declive da linha que representa os valores dos animais expostos é mais acentuado entre o 1º e o 4º mês.

Resultados de Microscopia Electrónica de Varrimento com Emissão de Campo (FESEM)

A figura 28 mostra a estrutura normal da parede dos cornos pulpaes nos dentes dos animais de controlo.

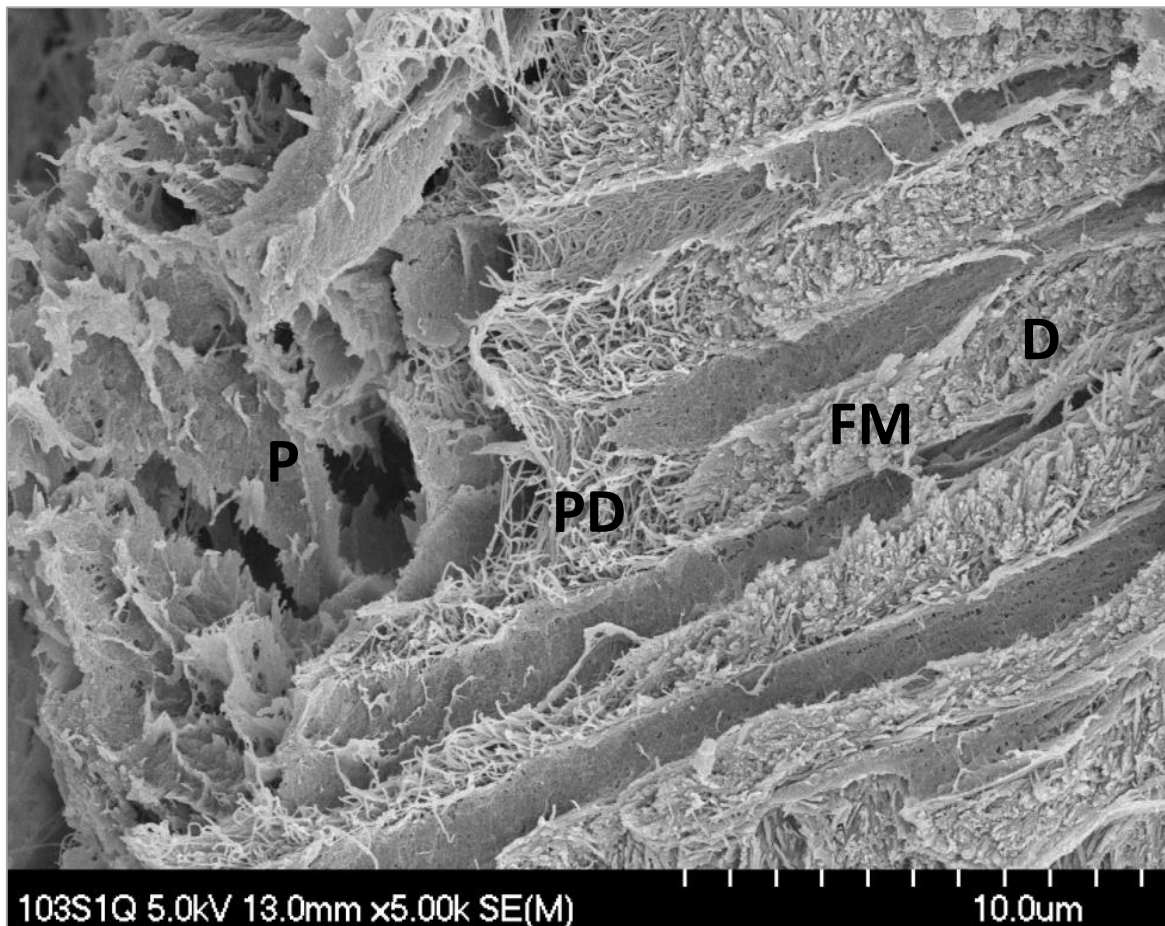


Figura 28 – Imagem de FESEM mostrando a parede do corno pulpar de um animal do grupo de controlo. P-polpa; PD-pré-dentina; FM-frente de mineralização; D-dentina.

Nos animais dos grupos expostos ao ruído industrial, as observações de FESEM mostraram a presença de uma estrutura em forma de banda entre a dentina e a polpa. A banda foi observada nas paredes dos cornos pulpaes (figura 29) no tecto da câmara pulpar (figura 30).

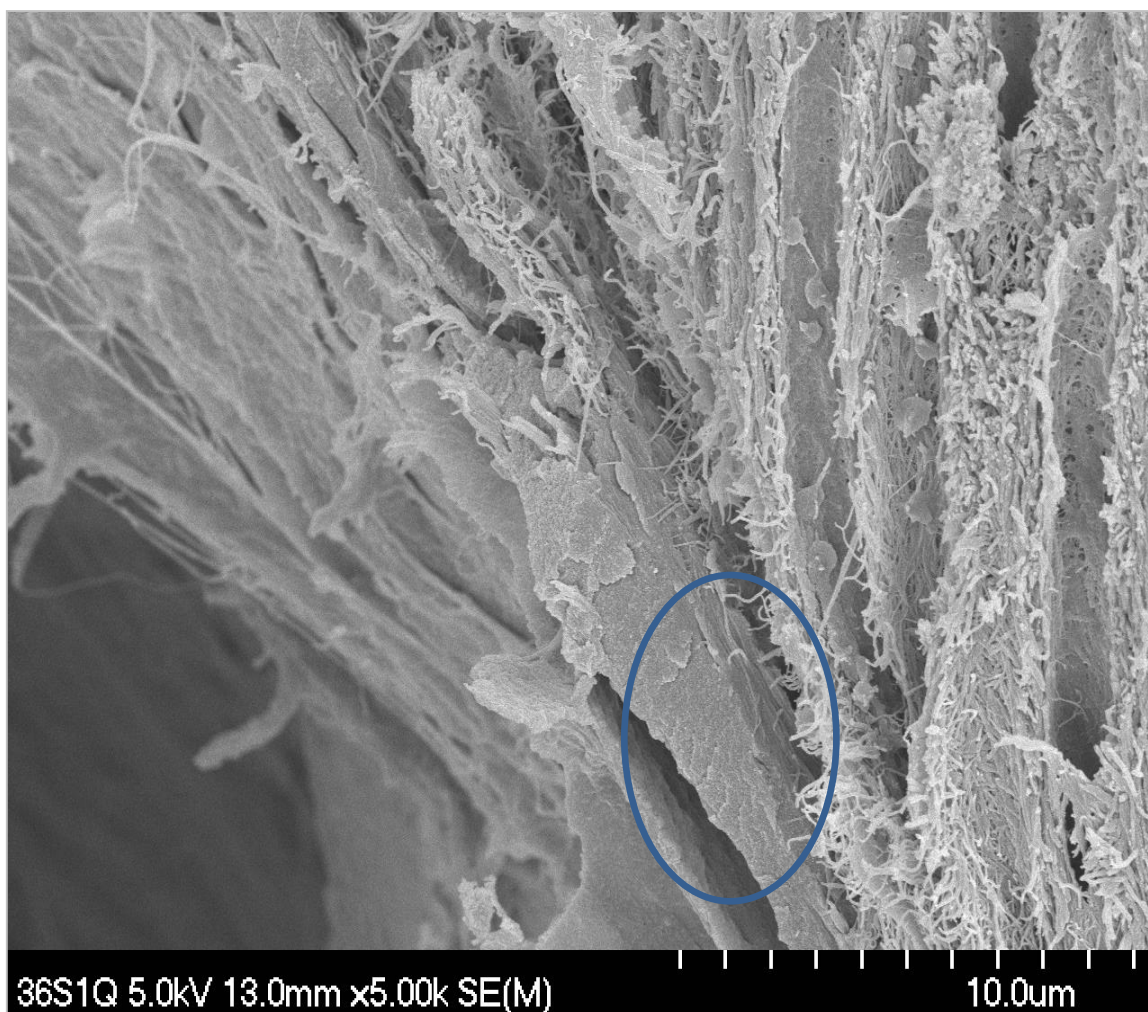


Figura 29 - Imagem de FESEM da parede do corno pulpar de um animal do grupo exposto ao ruído. Note-se a presença de uma estrutura em forma de banda quase compacta (círculo) entre a polpa e a dentina.

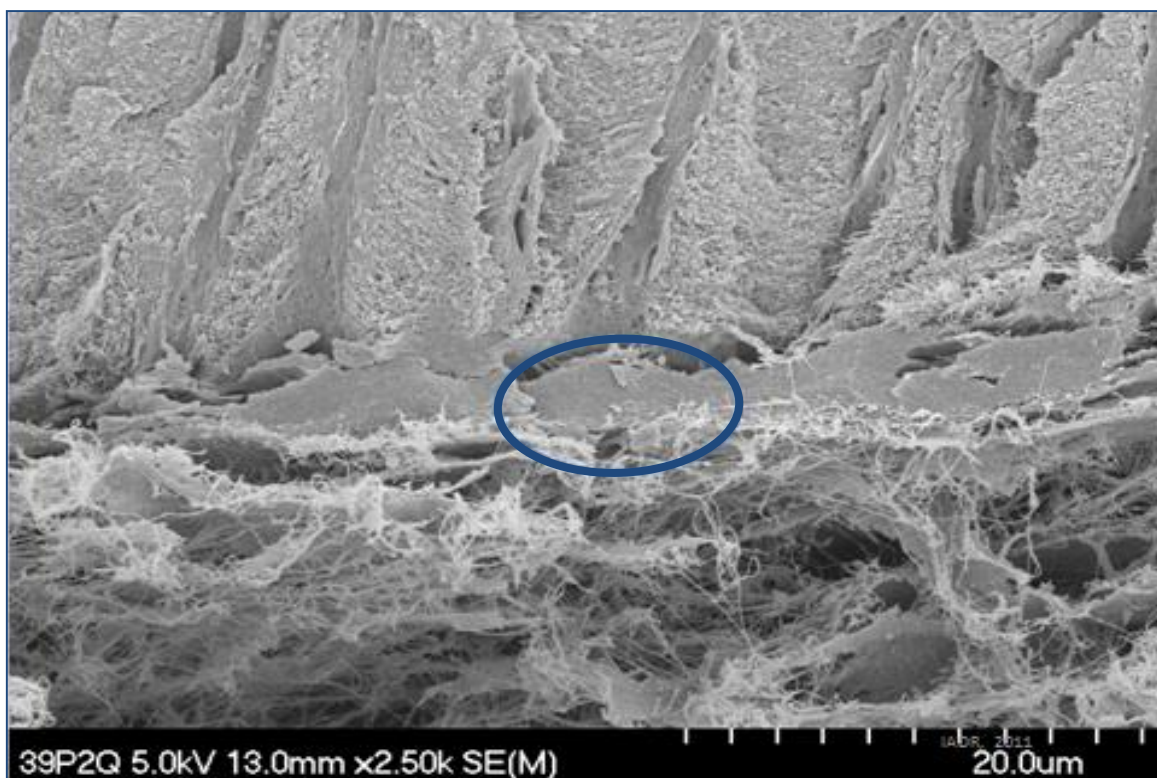


Figura 30 - Imagem de FESEM do tecto da câmara pulpar de um animal do grupo exposto ao ruído. Pode ver-se uma estrutura em forma de banda (círculo) entre a polpa e a dentina.

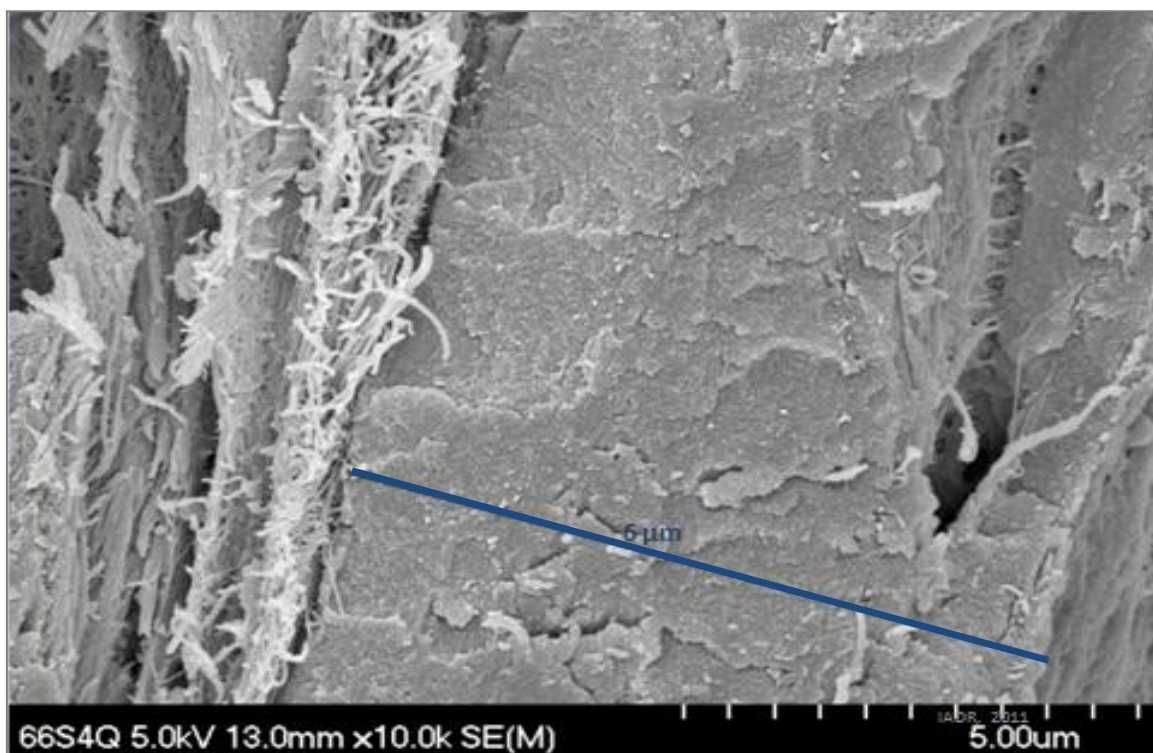


Figura 31 - Imagem de FESEM da parede do corno pulpar de um animal do grupo exposto ao ruído. A largura da estrutura em forma de banda atinge os 6µm.

A espessura da estrutura observada apresentou medidas de 2 a 6 μm (figura 31).

A banda não apresenta regular continuidade com os túbulos dentinários. Esta estrutura, quase compacta, apresenta poucos túbulos, onde foram identificados alguns prolongamentos odontoblásticos embebidos na estrutura mineralizada (figura 32).

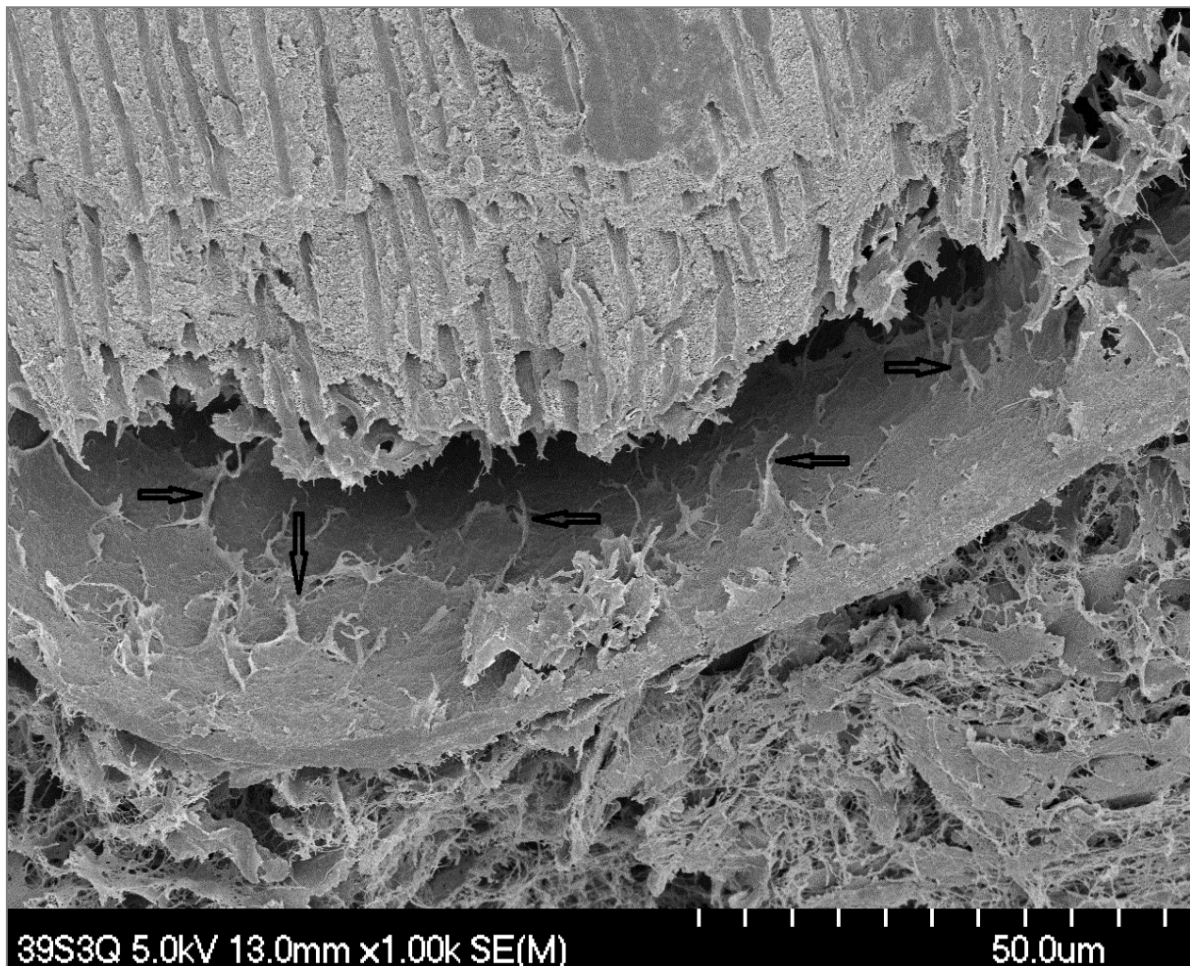


Figura 32 – Imagem de FESEM do tecto da câmara pulpar, onde observamos a estrutura vista de cima e separada da dentina. A estrutura é quase compacta e apresenta poucos túbulos. Podemos observar alguns prolongamentos odontoblásticos (setas) embebidos na estrutura mineral.

Foram observadas projeções tipo “tags” (figura 33) e fibras de colagénio “aprisionadas” na estrutura mineralizada (figura 33 e 34).



Figura 33 – Imagem de FESEM onde se observam projecções lembrando “tags” compatíveis com mineral (estrela). A fractura do dente mostrou que a formação da estrutura mineral começa no interior do túbulo dentinário.



Figura 34 – Imagem de FESEM mostrando as fibras de colagénio rodeadas pelo mineral (círculo). Observam-se algumas fibras de colagénio aprisionadas pela matriz mineralizada (setas).

Resultados de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Os nossos resultados de espectroscopia revelaram que a razão entre o cálcio (Ca) e o fósforo (P) na dentina normal é da ordem dos 1,448 (figura 35). E a análise elementar por EDS, na estrutura circumpulpar detectada, revelou tratar-se também de uma forma de hidroxiapatite com a razão Ca/P na ordem dos 1,563 e sem diferenças significativas em relação à dentina (figura 36).

No entanto, a banda apresentou valores absolutos mais altos de carbono (figura 36), indicando que a banda é mais carbonatada do que a dentina (figura 35).

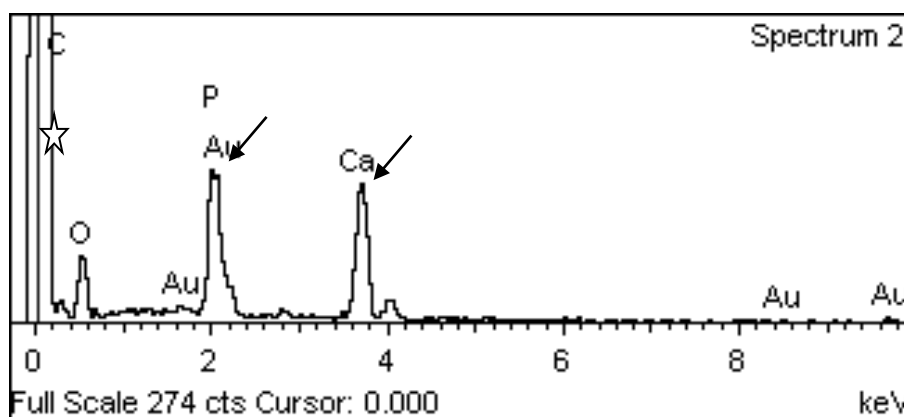


Figura 35 – Espectro de dentina, com representação dos picos de cálcio (Ca) e de fósforo (P) (setas). O carbono (C) e o oxigênio (O) também foram detectados (estrela). Nas apatites biológicas, a razão Ca/P varia entre 1,44 e 1,73. Os picos de ouro (Au) devem-se ao recobrimento das amostras.

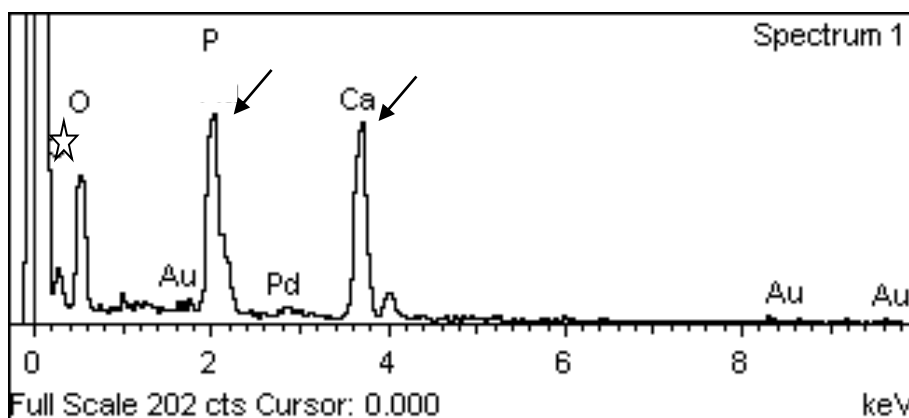


Figura 36 – Espectro da banda, com representação dos picos de cálcio (Ca) e de fósforo (P) (setas). O carbono (C) e o oxigênio (O) também foram detectados (estrela). Note-se que, embora os valores do Ca e do P sejam diferentes na banda, a razão Ca/P é similar à do espectro na dentina (setas). Os valores do C e de O indicam que a banda é mais carbonatada do que a dentina (estrela). Os picos de ouro (Au) e palladium (Pd) devem-se ao recobrimento das amostras.

A arquitectura (disposição) das fibras de colagénio na dentina circumpulpar também foi observada, tanto na dentina intertubular (figura 37), como na dentina peritubular (figura 38).

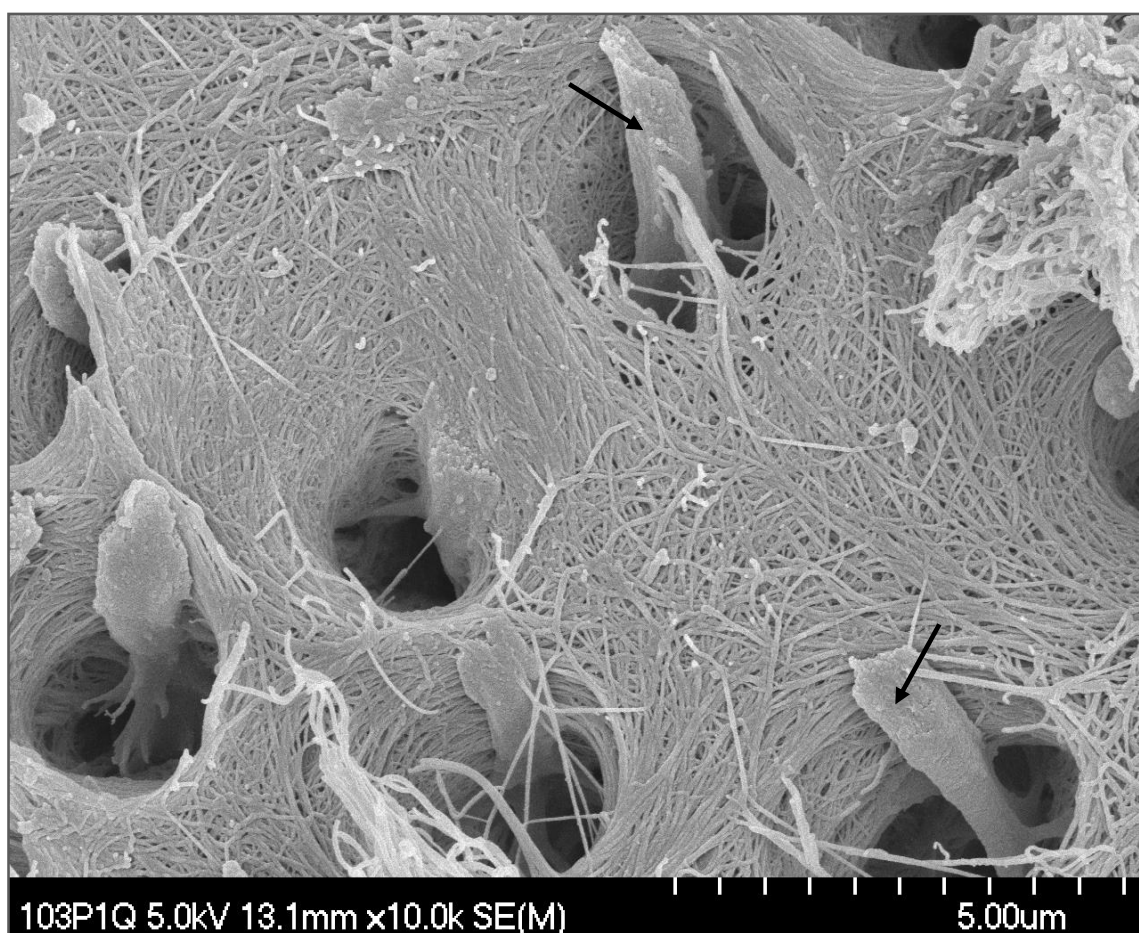


Figura 37 – Imagem de FESEM de um animal do grupo controlo - Observam-se as fibras de colagénio organizadas de forma regular e intrincada na área de dentina intertubular. Note-se também a presença de prolongamentos odontoblásticos no interior de alguns túbulos (setas).

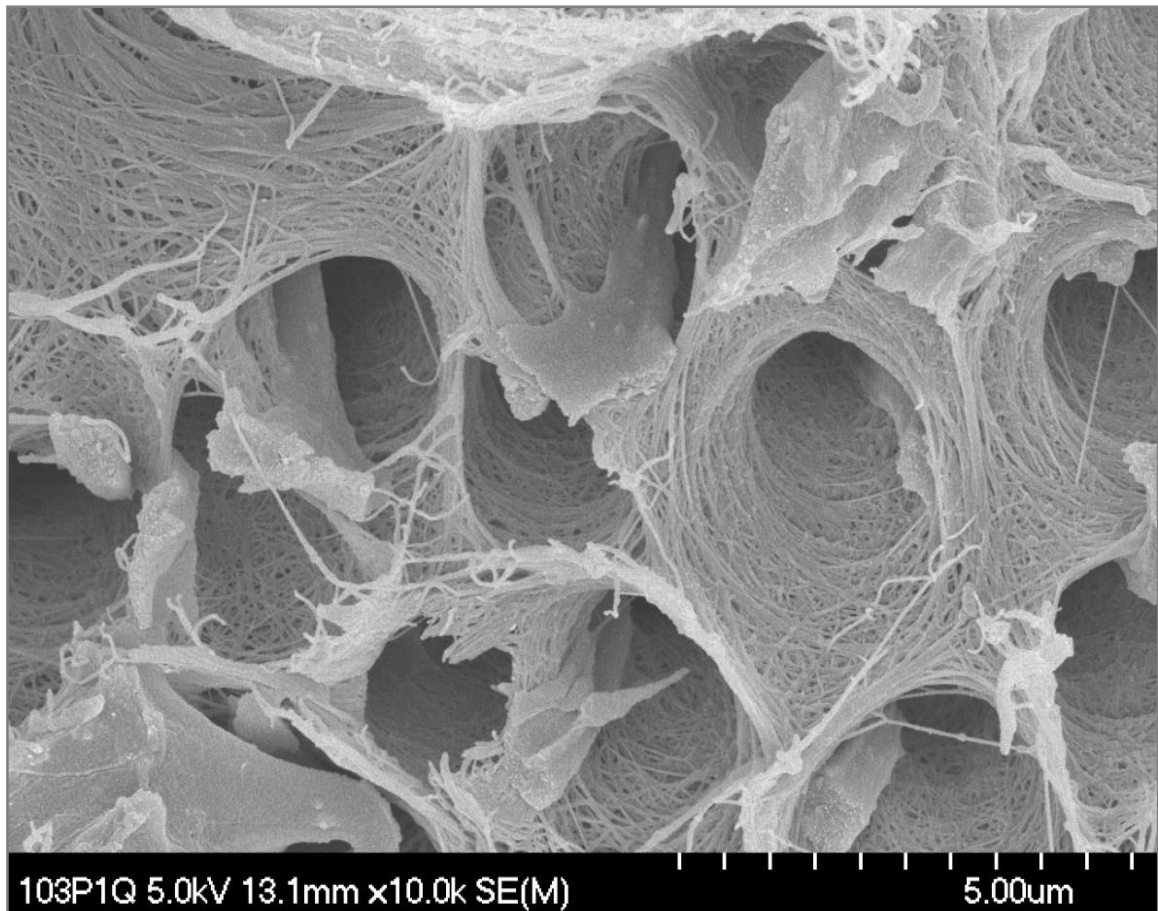


Figura 38 – Imagem de FESEM de um animal do grupo controlo - Observam-se as fibras de colagénio na dentina intratubular ou peritubular. Note-se a disposição concêntrica e regular das fibras.

Resultados de Microscopia Electrónica de Varrimento por Emissão de Campo na Lente (FEI-SEM) e *Immunogold*

As observações de FEI-SEM mostraram o alinhamento dos odontoblastos e dos seus prolongamentos na interface entre a polpa e a dentina (figura 39).

Observámos a organização das fibras de colagénio na dentina peritubular e na dentina intertubular (figura 39).

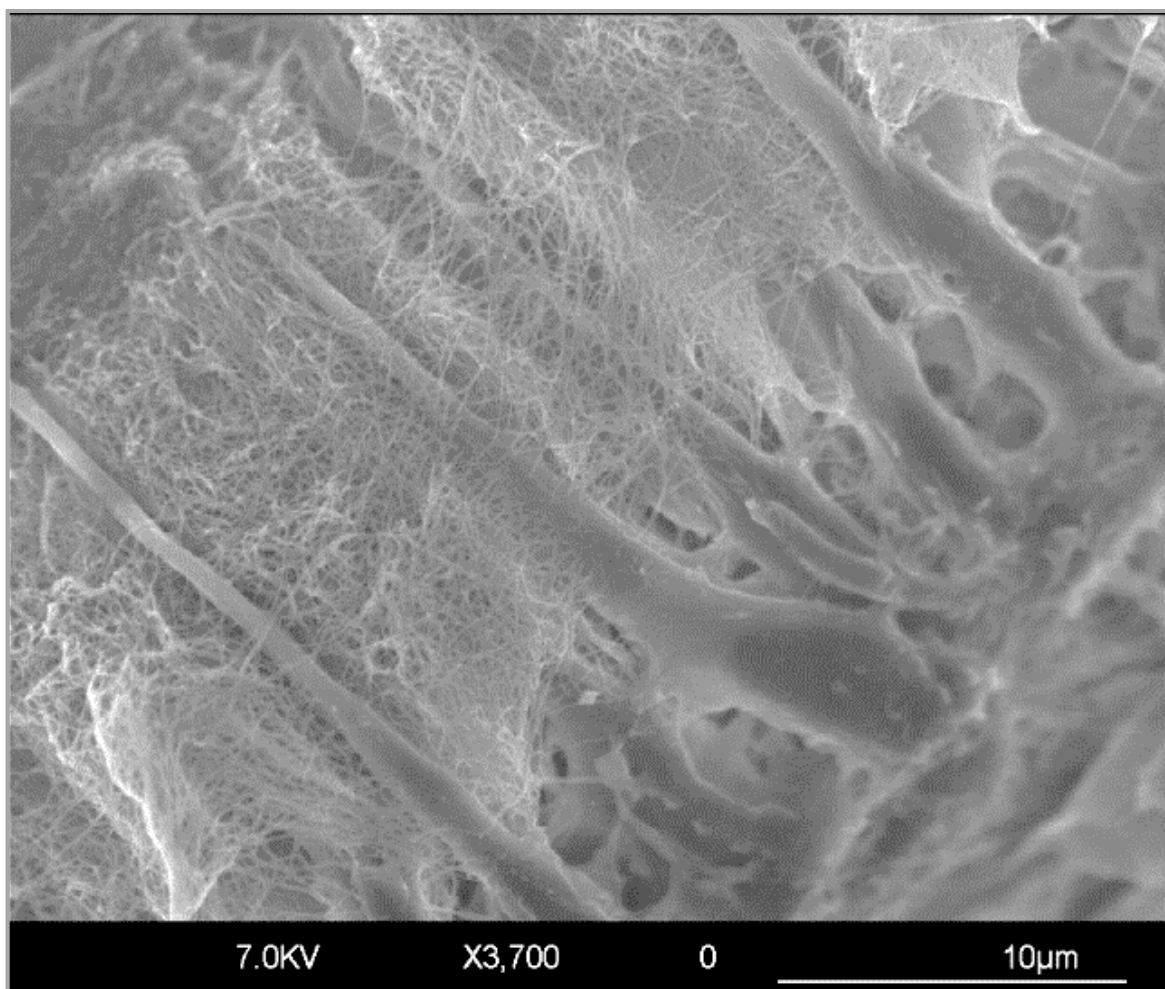


Figura 39 - Região de dentina circumpulpar. Com os corpos dos odontoblastos na polpa e os prolongamentos no interior dos túbulos dentinários. Observam-se as fibras de colagénio na área intertubular e na área peritubular a rodear os prolongamentos dos odontoblastos.

Os nossos resultados permitiram observar outros aspectos morfológicos muito interessantes dos odontoblastos no dente do rato Wistar.

Por FEI-SEM observámos as células odontoblásticas com os corpos na região da polpa, emitindo os seus prolongamento para a dentina (figura 40).

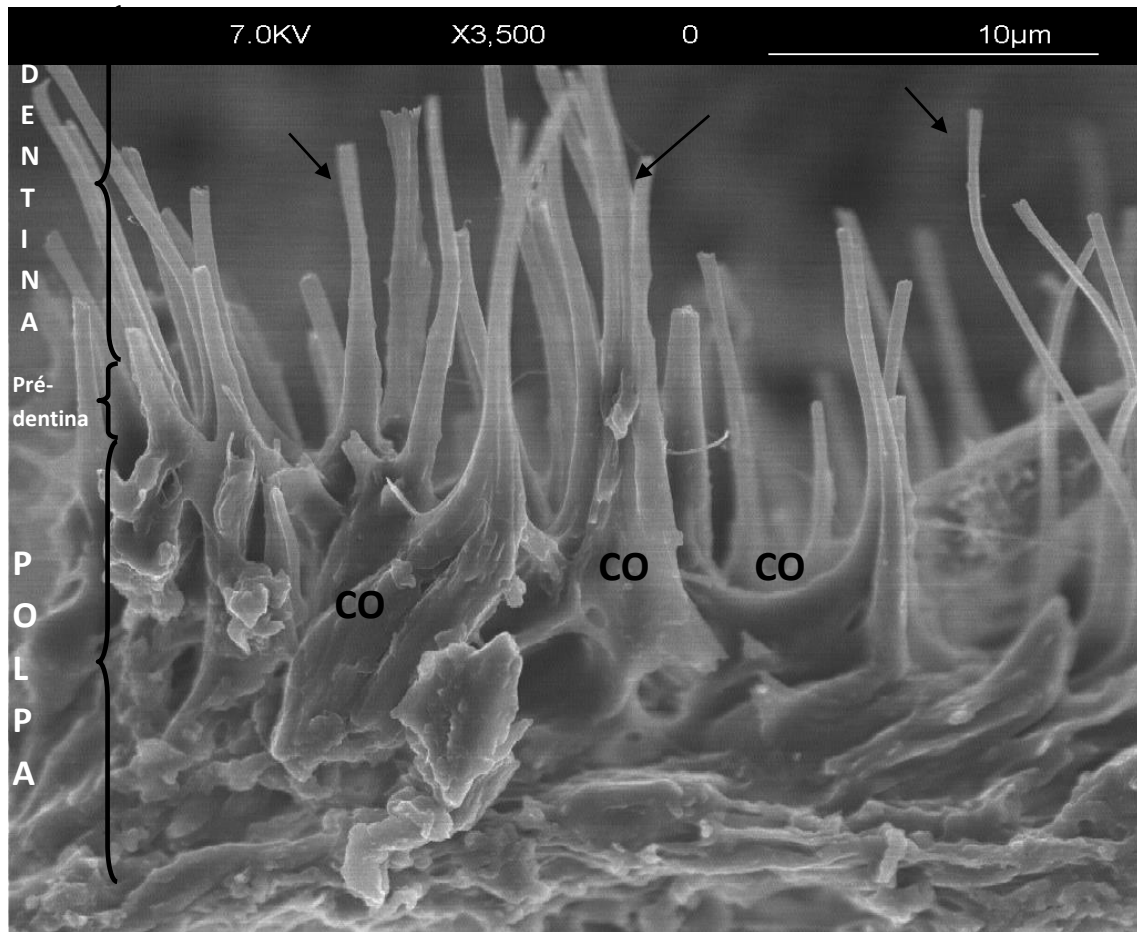


Figura 40 – Imagem de FEI-SEM mostrando os odontoblastos na região circumpulpar, com o corpo (CO) na zona da polpa e o prolongamento principal (setas) na dentina circumpulpar.

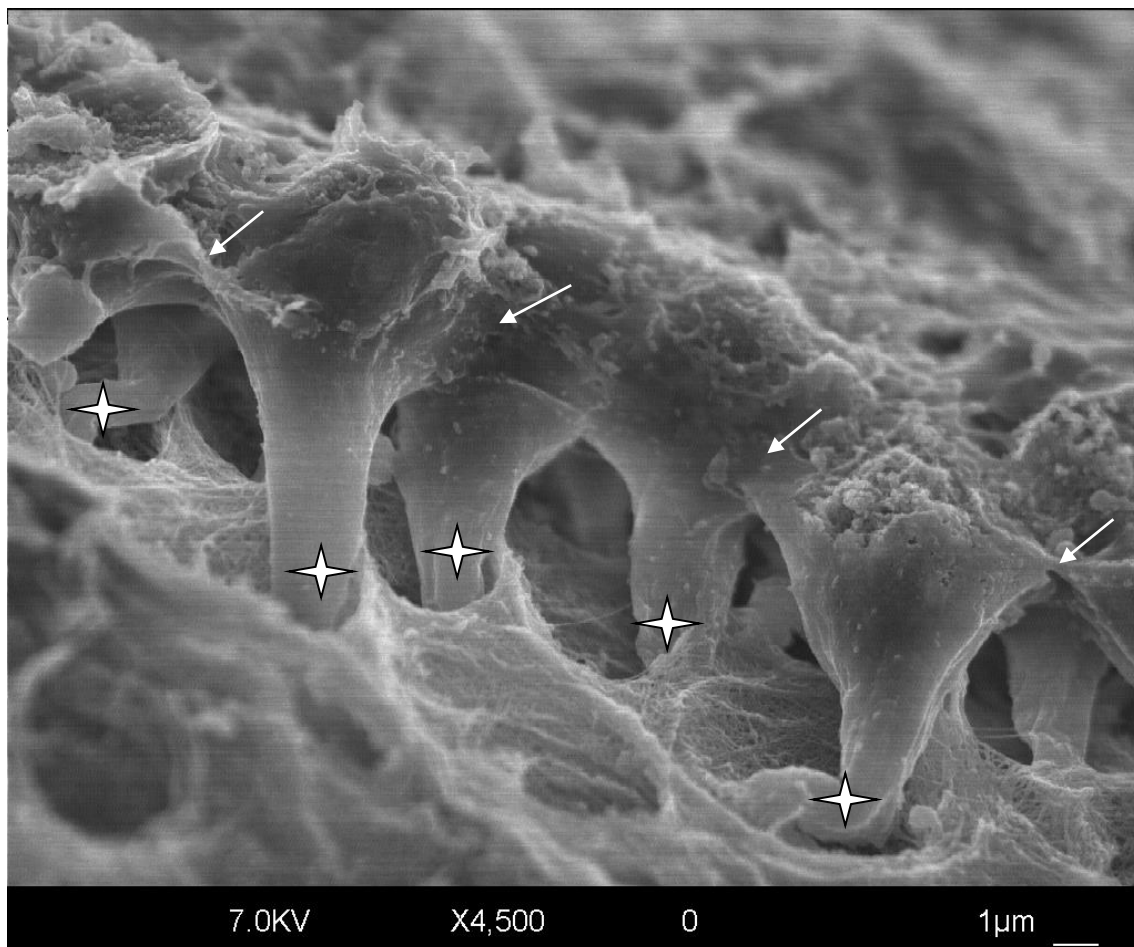


Figura 41 – Imagem de FEI-SEM a mostrar a disposição dos odontoblastos e as uniões entre os corpos (setas). Observam-se também os prolongamentos odontoblásticos a entrarem nos túbulos dentinários (estrelas).

As observações de FEI-SEM permitiram comprovar as fortes uniões entre os corpos dos odontoblastos (figura 41) e a disposição dos mesmos formando como que “um tapete” entre a polpa e a dentina (figura 41).

Os resultados de FEI-SEM mostraram que os prolongamentos odontoblásticos adjacentes também apresentam pontos de união entre si antes de entrarem nos túbulos dentinários (figura 42).

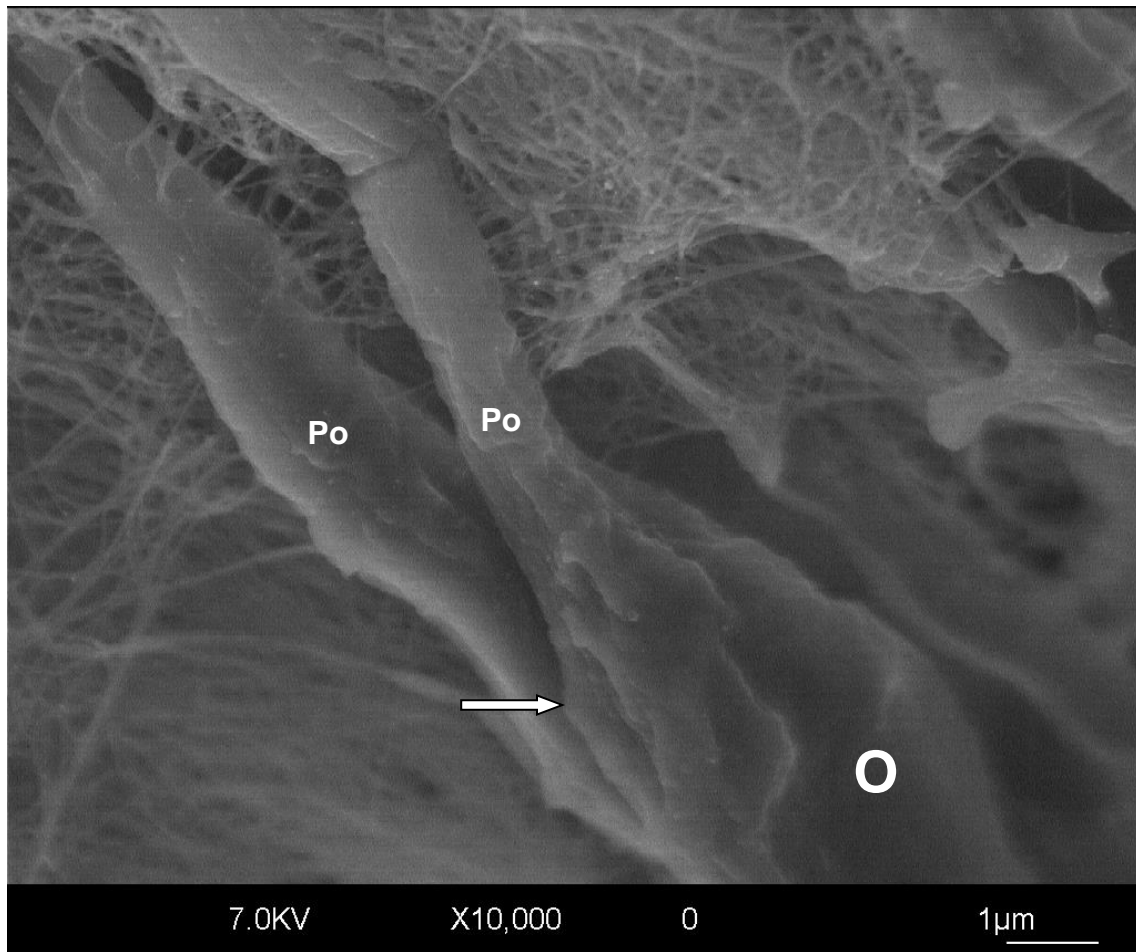


Figura 42 - Imagem de FEI-SEM onde se observa o corpo do odontoblasto (O) e os prolongamentos (Po) a estabelecerem uniões (seta) antes da entrada nos túbulos dentinários.

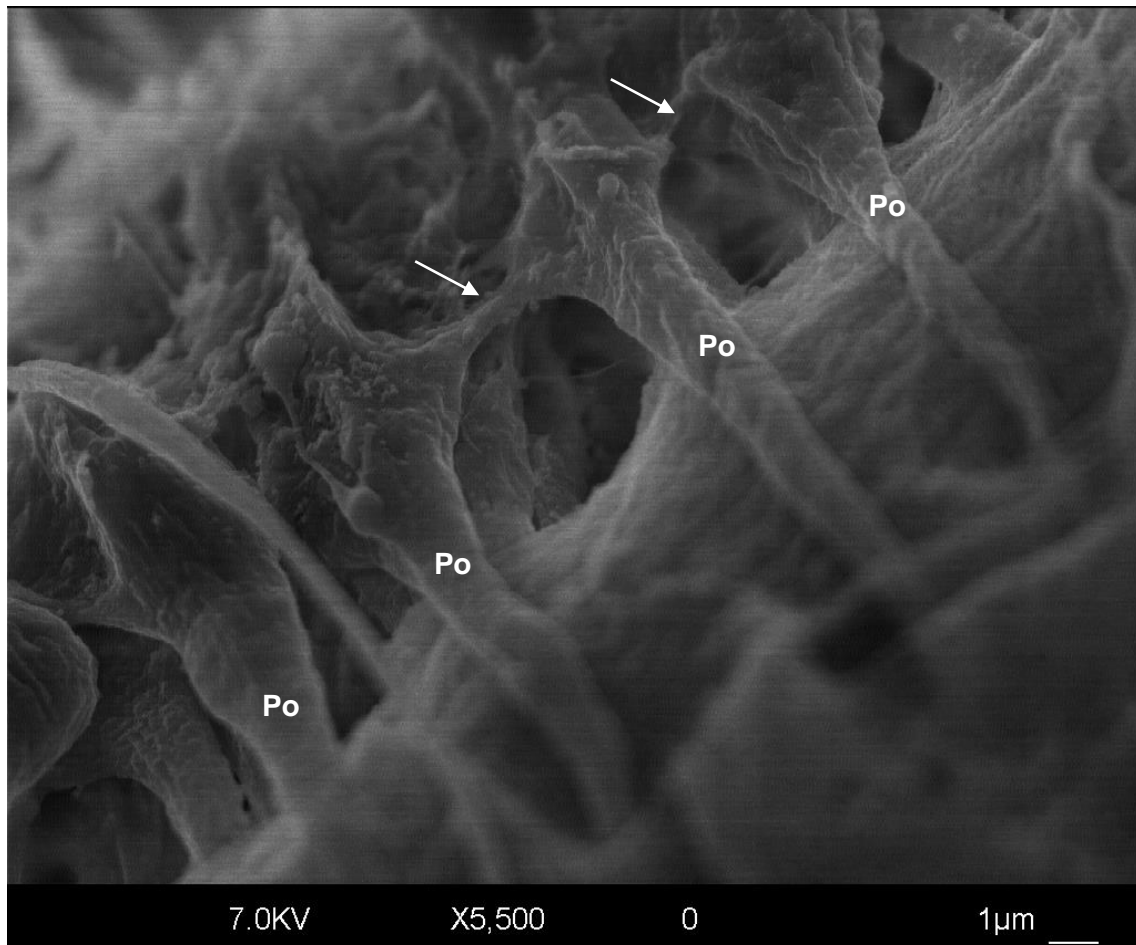


Figura 43 – Imagem de FEI-SEM mostrando o alinhamento dos prolongamentos odontoblásticos (**Po**) desde a polpa até à entrada nos túbulos dentinários. Observam-se pontes de união entre os prolongamentos (setas).

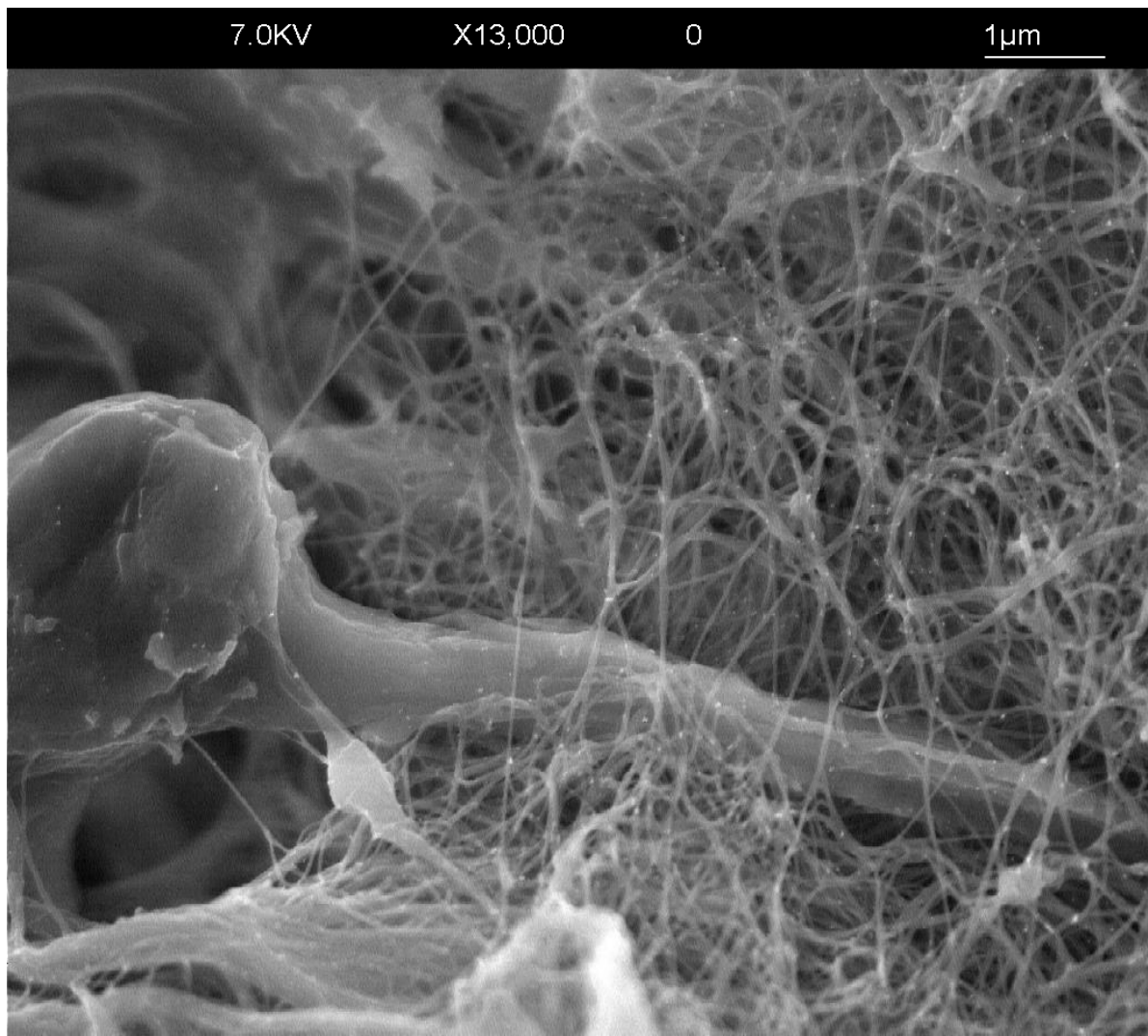


Figura 44 – Imagem de FEI-SEM mostrando uma célula odontoblástica muito bem preservada com o corpo globular e o prolongamento odontoblástico rodeado de fibras de colagénio marcadas pelas partículas de ouro (*immunogold*).

Com a marcação das fibras de colagénio I pelo *immunogold* (figura 44), observámos, nos animais de controlo, a organização das fibras de colagénio em redor dos prolongamentos dos odontoblastos formando uma malha mais regular, compacta e intrincada (figura 45) do que nos animais submetidos ao ruído, onde a malha de colagénio aparece mais espaçada e desorganizada (figura 46).

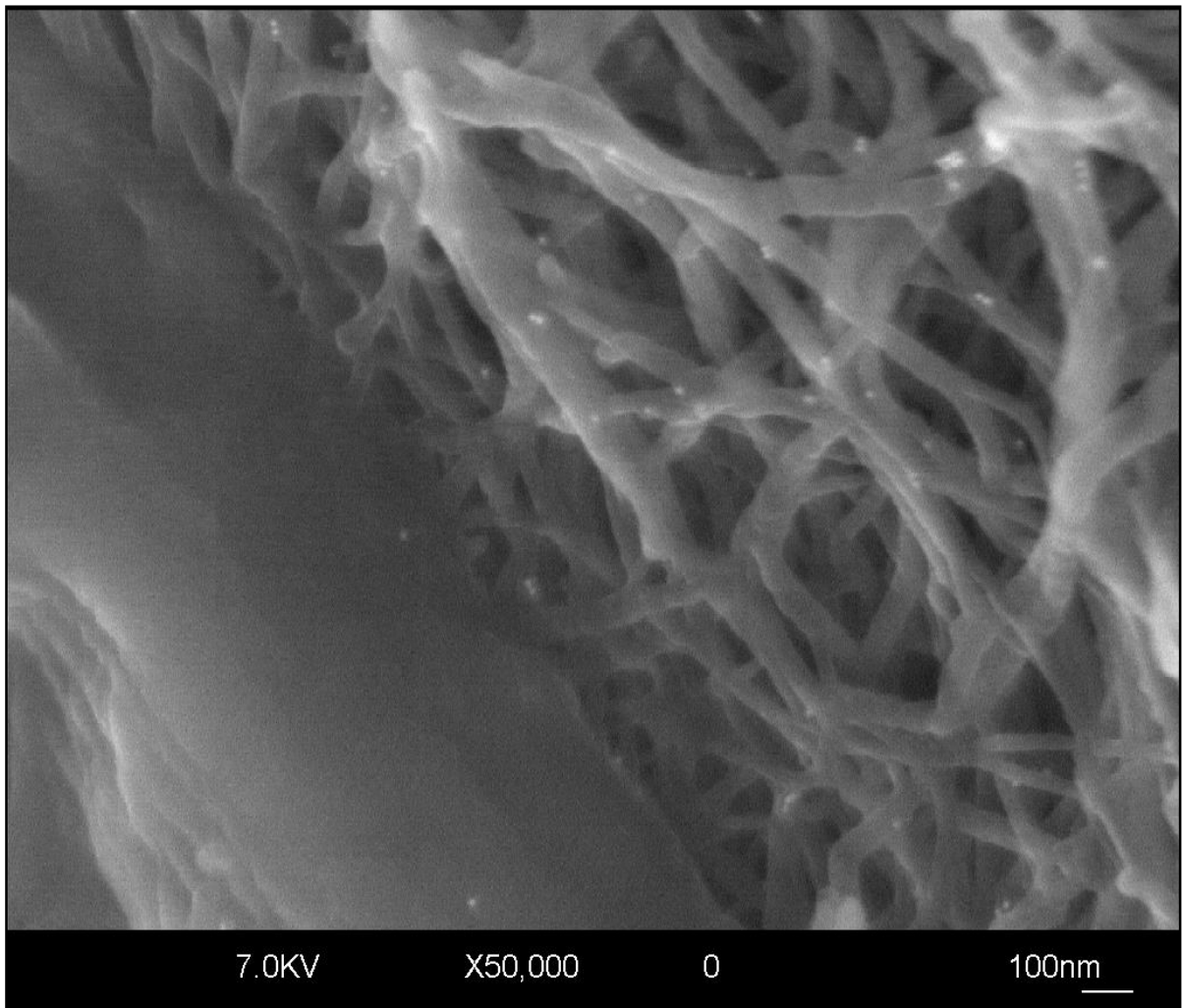


Figura 45 – Imagem de FEI-SEM de um animal do grupo de controlo - Prolongamento odontoblástico com a malha/rede de colagénio, onde se observam as fibras bem organizadas e com imuno-marcação do colagénio I (*immunogold*).

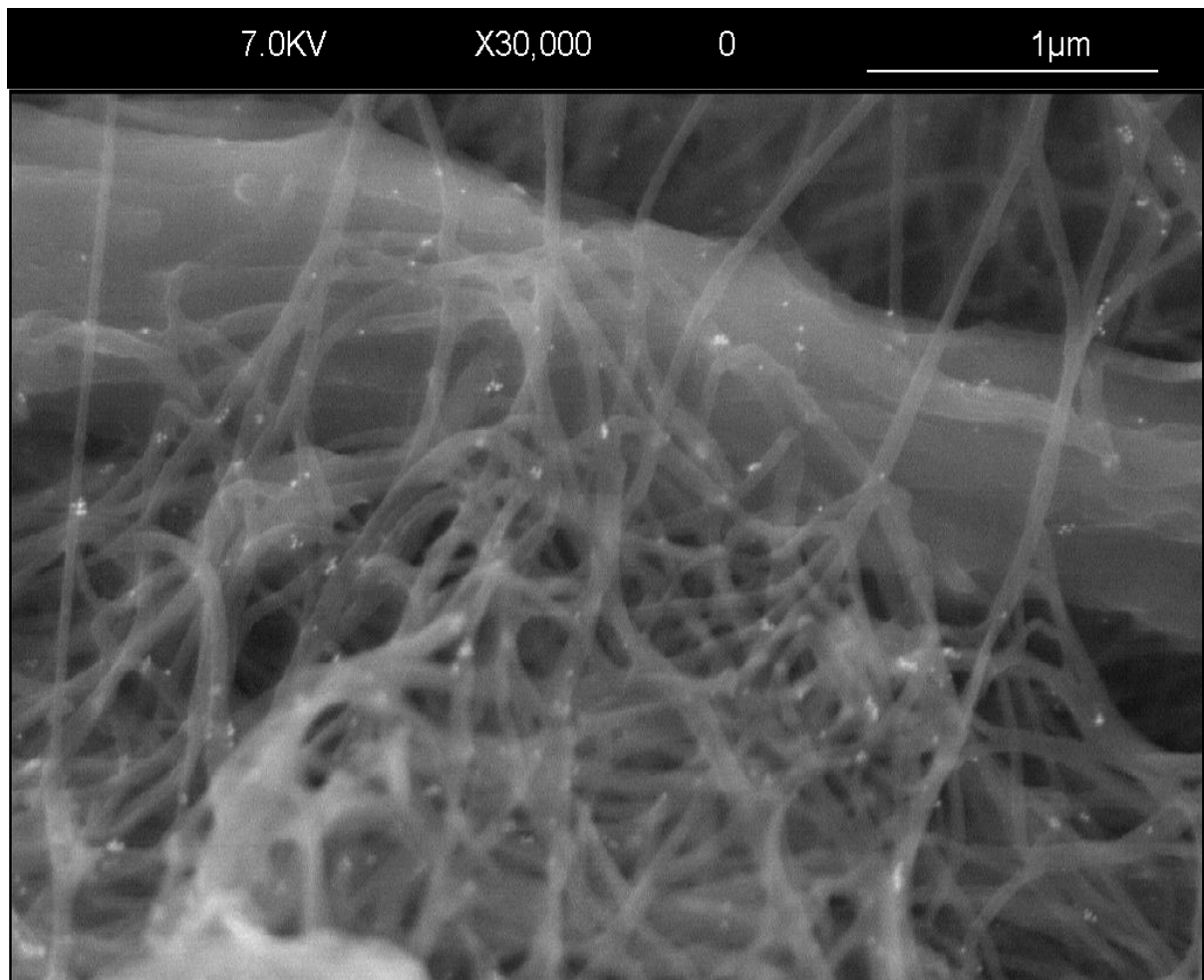


Figura 46 – Imagem de FEI-SEM de um animal do grupo exposto - Prolongamento odontoblástico rodeado pelas novas fibras de colagénio com uma boa marcação pelas partículas de ouro para o colagénio I (*immunogold*) e onde se observa a proliferação e desorganização destas fibras.

V – DISCUSSÃO

Os efeitos do ruído industrial (rico em componentes de baixa frequência - RBF) sobre os tecidos biológicos têm vindo a ser estudados por vários investigadores. Como tivemos ocasião de relatar, alterações morfológicas e funcionais já foram demonstradas em vários órgãos e sistemas. O nosso grupo documentou alterações ao nível da cavidade oral, concretamente das glândulas parótidas e do periodonto provocadas pelo RBF.

No nosso estudo procurámos avaliar se o ruído industrial também exerce efeitos ao nível do dente, uma vez que na revisão bibliográfica que fizemos não encontrámos estudos que estabelecessem uma relação clara entre os efeitos do ruído e alterações macroscópicas ou ultraestruturais do dente.

Nas nossas observações constatámos que a taxa de desgaste dentário é maior nos animais expostos ao ruído do que nos animais de controlo.

O desgaste dentário é uma condição irreversível com etiologia multifatorial e pode resultar de causas fisiológicas e/ou patológicas.

Na etiologia do desgaste dentário, os hábitos parafuncionais e o *stress* assumem um papel muito relevante. Na verdade, o bruxismo tem sido apontado como o hábito parafuncional mais associado ao desgaste dentário excessivo (Moore, 1956).

Alterações do estado emocional refletem-se na tensão muscular (Sainsbury e Gibson, 1954) e, em particular, na tensão dos músculos mastigadores (Burstone, 1946; Perry *et al.*, 1960). O estado emocional, como se sabe, é também regulado por áreas do comportamento, como o sistema límbico, o hipotálamo, o sistema reticular que, por meio dos eferentes δ , vai provocar hiperatividade muscular (circuito δ loop) (Cooper *et al.*, 2003, 2006).

Além do mais, é sabido que o *stress* ativa o sistema dopaminérgico. O sistema meso pré-frontal dopaminérgico desempenha um papel importante no controlo das emoções negativas, como o medo e a ansiedade (Reichlin *et al.*, 1983, 1985).

Na etiologia multifatorial do bruxismo encontramos o *stress* emocional entre as causas mais importantes (Rugh e Solberg, 1976; Glaros e Rao, 1977; Kleinberg, 1994). Os estudos de Rosales *et al.*, (2002) sugerem que o *stress* induz hiperatividade dos músculos mastigadores, nomeadamente dos músculos masseteres do rato, resultando em hábitos parafuncionais, como o bruxismo.

Nos nossos estudos parece existir uma correlação entre o *stress* provocado pelo ruído industrial e o aumento do desgaste dentário, uma vez que, de acordo com os resultados da análise estatística, nos animais submetidos ao ruído industrial o desgaste dentário que encontramos é significativamente maior ($p < 0,001$) do que nos grupos de controlo.

Evidenciámos que o desgaste dentário observado não é idêntico ao longo do tempo de exposição, i.e., é maior entre o primeiro e o quarto mês de exposição. De acordo com os nossos resultados, a partir do quarto mês de exposição, o desgaste dentário continua a acontecer, mas de forma menos rápida.

Para tentarmos compreender este facto, devemos ter em consideração vários aspetos, desde a resposta e adaptação do organismo ao *stress*/condições stressantes, à possível sensibilidade dentária quando se atinge um certo nível de desgaste, e devemos também levar em linha de conta a capacidade de resposta adaptativa do organismo e do complexo pulpo-dentinário aos estímulos/agentes agressores.

Vários estudos têm relacionado a exposição ao ruído industrial com o aumento do *stress* individual (Broner, 1978; Backteman *et al.*, 1984; Berglund *et al.*, 1996; Leventhall, 2004). Contudo, a resposta do organismo na exposição a estímulos agudos é diferente da resposta perante estímulos crónicos. A resposta ao *stress* por exposição a um estímulo agudo dá lugar a inúmeras alterações fisiológicas, com uma dramática alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Jones e Gillham, 1988).

Por outro lado, os estudos de Rosales *et al.*, (2002) reconhecem o *stress* como um factor determinante na hiperactividade dos músculos mastigadores. A contração dos músculos mastigadores conduz a um contacto entre os dentes, muitas vezes forçado. Sendo o ruído uma condição causadora de *stress*, o sistema estomatognático acaba por ser uma válvula de escape para a libertação desse *stress* (Slavicek, 2006).

Quando existe um aumento da tensão sobre os músculos mastigadores, a tendência é a de desencadear o contacto forçado entre os dentes, conduzindo muitas vezes a um desgaste dentário excessivo.

Um sinal oral do bruxismo é o aumento da atividade do músculo masseter, tanto em humanos (Sherman, 1985), como em animais (Landgren e Olsson, 1980; Yamada *et al.*, 1990; Shoji *et al.*, 1994; Sitthisomwong *et al.*, 2000); outro é o desgaste oclusal dos dentes. No desgaste observado nas coroas dos molares do dente do rato, reconhecemos que estão presentes lesões de erosão, de atrito e de abrasão.

As lesões por abrasão foram certamente potenciadas pela alimentação tendencialmente abrasiva, típica dos roedores. No entanto, este aspeto deve ser analisado de forma mais abrangente, uma vez que todas as formas de desgaste se potenciam umas às outras quando estão reunidos vários fatores etiológicos do desgaste (Bartlett *et al.*, 2000). No caso concreto dos nossos animais, acreditamos que o atrito provocado pelo contacto forçado entre os dentes, provavelmente pelo *stress* e bruxismo, combinado com as lesões de erosão que se observam nas superfícies dos dentes torna, até determinado nível, o tecido dentário mais fácil de desgastar. Também devemos ter em conta que, de acordo com estudos prévios do nosso grupo (Oliveira *et al.* 2007) nos animais expostos ao RBF, a saliva apresenta alterações qualitativas e quantitativas. Como já foi referido, a saliva revela-se um fator biológico importante no desgaste dentário, sobretudo nas lesões por erosão (Lussi e Jaeggi, 2008), que acresce ao *stress*.

Os nossos resultados levam-nos a concordar com Kovacevic e Belojevic, (2006), quando afirmam que há uma diferença no mecanismo de desgaste por abrasão relacionado com o ruído quando comparado com outros fatores ocupacionais. A exposição ao pó, aos ácidos ou maus hábitos, como o de morder objetos, têm uma acção direta sobre os dentes, mas o efeito do ruído é também indireto: aumentando a atividade dos músculos masseteres e, conseqüentemente, induzindo o aperto e o ranger dos dentes.

Como dissemos, as forças excessivas sobre os dentes têm sido associadas desde há muitos anos a um aumento da tensão dos músculos mastigadores (Kennebeck *et al.*, 1946) e ao bruxismo (Sognnaes, 1946) e, inclusive, já foram consideradas contributos importantes para o aumento de fraturas em dentes restaurados em pilotos durante o voo (Zadik *et al.*, 2006).

De acordo com os nossos resultados, a partir do quarto mês de exposição, o desgaste continua a acontecer, mas de uma forma menos severa.

Pensamos que, por um lado, pode ocorrer um processo de adaptação e de habituação do organismo às circunstâncias causadoras de *stress*, e, paralelamente, um mecanismo de defesa à dor bem como os efeitos da resposta dinâmica do complexo pulpo-dentinário, com a formação de dentina terciária, devem ser considerados.

No caso da exposição crónica, o agente de *stress* evoca, com o tempo uma resposta neuro-hormonal cada vez mais discreta (Pitman *et al.*, 1988). Assim, a reconhecida capacidade que os organismos têm de se adaptar às condições adversas deve ser aqui equacionada. A constante exposição a ambientes adversos que envolvam agentes agressores (irritantes) como ruído, poluição e conflitos interpessoais pode conduzir a uma

diminuição das respostas, pela adaptação ao *stress* repetido, com interações complexas entre os mecanismos de feedback negativo que surgem pela repetida libertação de glucocorticóides envolvidos na resposta ao *stress*, levando a uma resposta de habituação produzida pela exposição repetida ao estímulo stressante e de aprendizagem (Grissom e Bhatnagar, 2009); a exposição ao *stress* crónico leva a mudanças no estilo de vida que alteram comportamentos e saúde do indivíduo. A exposição crónica ao mesmo padrão de estímulos pode modular a resposta adaptativa do córtex adrenal, nomeadamente pela síntese e secreção de corticosterona. Esta resposta adaptativa expressa-se pelo retorno aos valores normais tanto da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) como da corticosterona (Pignatelli *et al.*, 1998). O *stress* crónico do tipo repetitivo pode induzir a secreção de corticosterona que permanece aumentada, apesar dos níveis de retorno ao normal da ACTH (Pignatelli *et al.*, 1998; Gesi *et al.*, 1999). Os estudos experimentais de Oliveira *et al.*, (2009) mostraram que, depois de sete meses de exposição ao ruído industrial, os ratos apresentavam uma inversão da resposta adrenal ao *stress* provocado pelo ruído, uma vez que havia um aumento da densidade de gotículas de lípidos quando comparados aos controlos, o que de acordo com os autores, sugere um fenómeno de fuga.

Oliveira *et al.*, (2009) acreditam que durante os primeiros meses de exposição ao ruído, existe uma intensa ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), devido aos estímulos descontínuos e repetitivos provocando episódios de *stress* agudo. Esta interpretação é apoiada pelos estudos de Koko *et al.*, (2004) que relataram de forma semelhante que a exposição ao *stress* térmico agudo provoca uma redução do volume da glândula adrenal (zona fasciculada) com depleção das gotículas de lípidos celulares e realce no volume adrenal (zona fasciculada). Alguns estudos (Melamed e Bruhis, 1996; Sudo *et al.*, 1996) associam a exposição crónica dos trabalhadores da indústria têxtil ao ruído com o aumento da excreção de cortisol urinário. Androgénios adrenais, tais como sulfato de dehidroepiandrosterona- (DHEAS), que é segregado pela zona fasciculada da glândula adrenal, também tem sido relatado como reforço, após o *stress* agudo provocado pelo ruído em seres humanos (Testa *et al.*, 1994). Estímulos de *stress* também são capazes de ativar a libertação de hormonas que são independentes do eixo HPA, como a prolactina, a qual se demonstrou capaz de induzir hipertrofia da zona fasciculada da adrenal (Robba *et al.*, 1985). No conjunto, as alterações morfológicas observadas na zona interior do córtex adrenal sugerem que há uma ativação do eixo HPA pelo *stress* (Oliveira *et al.*, 2009). Após a exposição crónica dos ratos ao ruído industrial, comprovaram-se alterações citológicas nas glândulas adrenais e os estudos sugerem a existência de uma resposta sustentada ao *stress* (Oliveira *et al.*, 2009).

Por outro lado, pode existir uma atitude defensiva para evitar a dor. Os estudos (Fernandes Neto, 2008) mostram que quando uma força excessiva é exercida sobre o dente, é ultrapassada a tolerância fisiológica que o ligamento periodontal tem para se adaptar e o reflexo nociceptivo é ativado. O “ranger dos dentes” também tem sido relatado nos estudos sobre as disfunções e patologias da articulação temporo-mandibular (ATM), apresentando prevalências na ordem de 27,2% (Melis e Abou-Atme, 2003) ou 20,5% (Conti *et al.*, 2003). Muito embora saibamos que a ATM dos roedores apresenta particularidades comparativamente à ATM do humano, julgamos que, ainda assim, o seu estudo pode ter importância sob o ponto de vista clínico e deve ser analisado no futuro.

O nosso estudo mostra que nos animais expostos, a taxa de destruição dos tecidos duros nos primeiros 4 meses de exposição ao ruído industrial foi de 39,2% da área total da coroa dos molares. Com estes dados, não é difícil de entender que a dentina e a polpa estão mais susceptíveis e/ou expostas a estímulos directos e/ou indirectos capazes de provocar dor.

Os estímulos recebidos pela dentina exposta são conduzidos à polpa dentária através dos neurónios aferentes sensoriais nociceptivos (Cook e McCleskey, 1997) e a tendência natural será a de evitar o contacto forçado entre os dentes numa atitude defensiva para evitar a dor. Os estudos de Vang *et al.*, (2012) mostraram que, apesar da maioria dos neurónios da polpa dentária serem nociceptivos, também não devemos descartar a subpopulação de neurónios mielinizados, não-nociceptivos que podem servir como mecano transdutores ao detetarem alterações do fluido dentinário durante o bruxismo, aspecto que consideraremos mais adiante. É possível que o processamento alterado da informação a partir destes grandes neurónios mielinizados possa também contribuir para a hipersensibilidade da dentina, mesmo quando a estimulação mecânica seja de baixo limiar (Vang *et al.*, 2012) pois, para além de nociceptores polimodais e específicos, cada órgão tem também um conjunto de mecanorreceptores de baixo limiar relacionados com as suas funções específicas e reflexos sensoriais, alguns dos quais relacionados com o mecanismo da dor (Woolf e Doubell, 1994).

É importante considerar as respostas dos pequenos axónios mielinizados (A-delta) e dos axónios amielinizados (C) aos estímulos fortes (nociceptivos), mas também não devemos descurar outras fibras nociceptivas específicas que pertencem ao sistema “receptor polimodal” (Kumazawa, 1996) pela sensibilidade a muitos estímulos (mecânicos, químicos, térmicos), pela participação em reflexos autónomos e pela ativação/excitação do sistema nervoso. Na verdade, os dentes têm uma elevada densidade de terminações

recetoras polimodais na polpa coronária e na dentina (Byers e Närhi, 1999). Esta organização estrutural única afeta as funções sensoriais do dente e ativa os nervos intra pulpares em resposta a diferentes estímulos externos, induzindo sensações dolorosas (Byers e Närhi, 1999).

Este aspeto fisiológico da dor não pode ser objetivado no nosso estudo, porque, na verdade, a dor dentária não tem, muitas vezes, uma correspondência com alterações histopatológicas (Brännström *et al.*, 1981; Byers e Närhi, 1999), a não ser que haja uma condição inflamatória, como a pulpite, já em avançado desenvolvimento. Ainda assim, os estudos mostram que o desgaste dentário, ao expor os túbulos dentinários, provoca alterações do fluido dentinário. Estas alterações no movimento do fluido são sentidas pelos odontoblastos por intermédio dos canais mecano e termosensíveis (Bleicher, 2013). A activação dos odontoblastos pode levar à secreção de moléculas sinalizadoras como ATP ou neurotransmissores capazes de iniciar a sensação de dor (Bleicher, 2013).

Apesar de sabermos que, no molar do rato o esmalte oclusal é descontínuo e é a dentina reparadora no topo dos cornos pulpares que dificulta a transmissão de forças hidrodinâmicas para a polpa (Byers e Närhi, 1999), como uma forma de proteção, a inervação dos dentes deve ser considerada parte de um sistema sensorial maior, que também inclui o ligamento periodontal, gengiva e lábios (Olgart, 1996; Maeda e Byers, 1996). Assim, a informação tátil dos dentes também depende dos mecano receptores de baixo limiar do ligamento periodontal e das fibras dento-gengivais. A dor relacionada com o dente pode ter origem na polpa, na dentina ou no ligamento periodontal. Este aspeto pode também relacionar-se, de alguma forma, com os resultados dos estudos prévios do nosso grupo (Mendes *et al.*, 2007) acerca do impacto do RBF no ligamento periodontal.

A inervação sensorial do dente envolve a dinâmica do fluido dentinário, a regulação do fluxo sanguíneo pulpar e reflexos de proteção para preservar os tecidos dentários (Byers, 1984; Matthews e Vongsavan, 1994; Närhi *et al.*, 1994; Hildebrand *et al.*, 1995; Olgart, 1996; Pashley, 1996; Fristad *et al.*, 1997; Jontell *et al.*, 1998). Existe evidência de que alguns dentes podem conter neurónios sensíveis à vibração, os mecanorreceptores A-beta (Dong *et al.*, 1985, 1993), que podem funcionar como pré-avisos de dor na agressão dentinária (Mumford e Bowsher, 1976; Virtanen *et al.*, 1987).

A organização estrutural dos diferentes tipos de fibras nervosas da polpa está relacionada com as propriedades funcionais da polpa dentária, incluindo as áreas recetoras e a sua sensibilidade na estimulação dentinária (Närhi *et al.*, 1996).

No molar do rato, a densa inervação ocupa toda a polpa devido ao tamanho reduzido da mesma (Sarram *et al.*, 1997); proporcionalmente, a inervação nos dentes dos cães e dos macacos ocupa muito menos volume na polpa (Byers e Dong, 1983; Byers *et al.*, 1987), sendo estes últimos exemplos os que apresentam um gradiente mais parecido com o dos dentes humanos (Lilja, 1979). No entanto, parece haver um número surpreendente de fibras nervosas na dentina radicular do dente humano (Maeda *et al.*, 1994), e que pode explicar a grande sensibilidade aquando da exposição da dentina radicular (Närhi *et al.*, 1992; Kontturi-Närhi e Närhi, 1993). A inervação dentinária é quase nula nos dentes continuamente em erupção, como, por exemplo, os dentes incisivos de roedores e os dentes do coelho (Bishop, 1995).

Quanto à inervação autónoma do dente, as fibras nervosas simpáticas na maioria dos dentes são menos numerosas do que os nervos sensoriais (Fried *et al.*, 1988; Oswald e Byers, 1993), e existem diferenças importantes entre espécies na sua distribuição relativa (Pohto e Antila, 1972). Numerosos estudos farmacológicos demonstraram que a vasoconstrição da polpa dos mamíferos se relaciona principalmente com os receptores α_1 adrenérgicos, mas que também envolve receptores α_2 e neuropéptido-Y (NPY) na vasoregulação (Edwall *et al.*, 1985; Kim, 1985; Olgart *et al.*, 1989; Olgart, 1996). Já a identificação das fibras parassimpáticas é controversa, com identificação positiva por alguns pesquisadores (Akai e Wakisaka, 1990; Casasco *et al.*, 1990; Olgart, 1996), mas não por outros (Sasano *et al.*, 1995). A regulação parassimpática do fluxo sanguíneo noutros tecidos está associada à atividade de ADPHdiaforase e óxido nítrico (NO) e ambas as atividades foram encontrados nas células da polpa dentária (Kerezoudis *et al.*, 1993). Embora a maioria dos resultados atuais indiquem que o controlo parassimpático da circulação pulpar normal é de menor importância (Olgart, 1996), alguns estudos em humanos mostram efeitos importantes (Aars *et al.*, 1993).

Existem também mecanismos não-neuronais na regulação da hemodinâmica pulpar que envolvem o óxido nítrico (NO) e as endotelinas (ET), bem como importante vaso regulação pelos neuropéptidos sensoriais (Olgart, 1996). Acredita-se que a estimulação hidrodinâmica pode induzir um aumento imediato do fluxo de sangue na polpa (Olgart, 1996).

Alguns ramos terminais de grandes fibras nervosas têm longas ramificações, com um padrão de orientação perpendicular e um conjunto de prolongamentos odontoblásticos na pré-dentina, e têm largas uniões adesivas com esses odontoblastos (Corpron e Avery, 1973; Gunji, 1982; Byers, 1984, 1985; Maeda *et al.*, 1987; Byers, 1994). As suas terminações nervosas são capazes de suprir as funções mais sensíveis das fibras A-beta

e A-delta, porque (1) os numerosos estudos de mecanismos hidrodinâmicos na dentina sugerem que os nervos mais sensíveis e de maior velocidade de condução conseguem detectar o movimento inicial do fluido nos túbulos dentinários (Brännström *et al.*, 1981); (2) os odontoblastos são facilmente movidos para dentro ou para fora a partir da dentina por perturbação do fluido dentinário (Brännström *et al.*, 1981; Närhi e Hirvonen, 1987; Byers *et al.*, 1988); (3) e a existência das junções adesivas nervo-odontoblasto foram comprovadas por microscopia electrónica (Corpron e Avery, 1973; Byers, 1984; Byers *et al.*, 1990), permitindo acreditar na capacidade das fibras nervosas para detectar o movimento dos odontoblastos (Bleicher, 2013). E, como mostram os nossos resultados de FEI-SEM, estabelecem-se entre as células odontoblásticas vários pontos de ligação capazes de as manterem fortemente unidas, “arrastando-se” umas às outras e, conseqüentemente, transmitindo os estímulos ou “passando o testemunho” entre si. Alguns estudos (Magloire *et al.*, 2004) defendem que a transdução no odontoblasto implica uma prévia sinalização que conduz a uma cascata de eventos onde não devemos descurar o papel do cílio primário existente nestas células (Bleicher, 2013).

Os nossos resultados parecem estar de acordo com as conclusões de outros estudos que afirmaram que estímulos não invasivos como a vibração (Dong *et al.*, 1985; 1993) e o frio (Ahlquist *et al.*, 1984; Jyväsjärvi e Kniffki, 1987) conseguem estimular as fibras nervosas do dente sem provocar inflamação e danos pulpares. Estímulos pouco agressivos são suficientes para induzir mudanças reflexivas no fluxo sanguíneo via ação dos neuropéptidos sensoriais na vascularização do músculo liso oposta à atividade nervosa simpática (Olgart, 1996). A estimulação elétrica de dentes afeta o fluxo de sangue também via libertação de neuropéptidos sensoriais (Gazelius *et al.*, 1987; Heyeraas *et al.*, 1994; Olgart, 1996).

Recordamos que o prolongamento do odontoblasto é banhado pelo fluido dentinário no interior do túbulo dentinário e pode ser condicionado por estímulos externos (Bleicher, 2013). Estes dados obrigam-nos a pensar na possível influência que a dinâmica do fluido dentinário pode ter na condução de estímulos à polpa, pelo que realçamos os nossos resultados de FEI-SEM, onde observámos, não apenas as uniões entre as células odontoblásticas, como também as comunicações existentes no *borderline* entre os prolongamentos e os corpos de células odontoblásticas adjacentes. As nossas observações de FEI-SEM levam-nos a concordar com os estudos de Callé (1985) e de Bleicher (2013) quando se referiram aos locais entre o prolongamento do odontoblasto e o corpo do odontoblasto como “zonular tight junctions” considerando-os verdadeiros “terminal webs” capazes de manter os odontoblastos alinhados como uma camada de células do tipo epitelial. Reforçamos que já foram observados complexos juncionais entre

os corpos dos odontoblastos. Os exemplos são os desmossomas, envolvidos na adesão celular, as “gap junctions” participantes na comunicação intercelular e as “tight junctions” com papel na regulação ou transporte de moléculas ou iões (Holland, 1976; Callé, 1985; Ushiyama, 1989, Bleicher, 2013).

Paralelamente, outros aspectos devem ser levados em linha de conta, como a reconhecida capacidade de resposta do complexo pulpo-dentinário, por norma, formando dentina terciária, uma vez que o aumento da espessura de dentina funciona como uma protecção para a polpa.

Os nossos resultados comprovam que o desgaste dentário encontrado parece repercutir-se noutras alterações ao nível da estrutura do dente, nomeadamente na dentina circumpulpar indo de encontro aos vários estudos que mostraram que o dente responde aos agentes agressores através do complexo pulpo-dentinário (Murray *et al.*, 2002; Bleicher, 2013).

Os estímulos agressores para o dente provocam resposta por parte do complexo pulpo-dentinário, mas nem todos os agentes agressores estimulam de igual forma este complexo, existem vários tipos e diferentes intensidades de noxas. E, claramente a intensidade da resposta é que pode ser variável, de acordo com o (s) agente (s) agressor (es) em causa.

Na literatura, é comum encontrarmos a seguinte classificação dos agentes agressores sobre o dente em geral: leves, médios ou severos.

Por outro lado, os agressores ou estímulos específicos sobre a polpa dividem-se em ligeiros ou transitórios, intermédios e irreversíveis (Byers e Närhi, 1999).

Os danos ligeiros sobre o dente não provocam invasão leucocitária, mas são capazes de desencadear pequenas áreas de inflamação neurogénica e causar dano mecânico promovendo estímulo nervoso e dentinogénese reativa (Byers e Närhi, 1999). Nestes casos, os odontoblastos primários sobrevivem, a reação nervosa sensorial da camada sub-odontoblástica é limitada e breve (Byers e Närhi, 1999). Exemplos destes estímulos são o desgaste cervical da dentina, o desgaste e exposição da dentina na região superficial da coroa nos molares do rato (Byers *et al.*, 1988). As forças ortodônticas (Kvinnslund e Kvinnslund, 1990) e a sobreoclusão (Kvinnslund *et al.*, 1992) também podem provocar estimulação nervosa sem que ocorram danos óbvios na polpa e este aspeto é comumente constatado na nossa prática clínica diária. Lesões superficiais na dentina, por exemplo pela preparação de cavidades, provocam um aumento transitório da síntese pulpar de factor de crescimento neural (NGF), e os receptores do NGF têm sido

encontrados na periferia da polpa dentária. A expressão de ambos aumenta na polpa lesada (Berkovitz *et al.*, 2004) e assiste-se às subseqüentes reações sensoriais durante alguns dias (Byers *et al.*, 1992b).

Estudos histológicos de dentes humanos (Brännström *et al.*, 1981) têm mostrado regiões similares às da dentinogênese reativa após estes estímulos. Estes aspetos vão de encontro aos das nossas observações histológicas nos dentes molares do rato nos grupos de controlo, onde constatamos que, quando existe leve desgaste oclusal nas coroas, observa-se a formação de dentina terciária focal no topo dos cornos pulpaes, sem outras alterações de relevo em M.O.

Curiosamente, em dentes de rato, o atrito lento de coroas dentárias durante a utilização normal, pode expor os nervos intradentinários quase à superfície oclusal sem alterar os reflexos de abertura da mandíbula (Byers *et al.*, 1982).

Os estímulos intermédios já causam alguma destruição à periferia da polpa, e o consequente preenchimento destas áreas pela dentinogênese reparadora, como mostram os estudos de Byers e Närhi (1999). Estes agressores causam destruição de alguns odontoblastos primários que são substituídos pelas células “tipo-odontoblasto” que provêm da camada sub-odontoblástica (Fitzgerald, 1979). Após esta mudança fenotípica, as células sub-odontoblásticas deixam de ter baixa afinidade para o recetor de neurotrofina p75 e começam a sintetizar matriz reparadora (Byers *et al.*, 1990, 1992b). A invasão de monócitos pode ocorrer com estas lesões intermediárias (Bergenholtz *et al.*, 1991; Ferrari e Byers, 1996), juntamente com o desenvolvimento de pequenos abscessos (Byers *et al.*, 1990; Arai, 1991), mas essas reações podem ser um mal menor se a perda de tecido pulpar for muito pequena (Sato, 1989). Qualquer tipo de preparação cavitária que seja suficientemente profunda ou seca o suficiente para causar aspiração e destruição de odontoblastos causará este tipo de lesão intermédia (Närhi e Hirvonen, 1987; Byers *et al.*, 1988).

Os estímulos mais severos, como a exposição pulpar ou quadros de infeção que afetam a polpa podem levar à pulpíte com possibilidade de evolução para necrose pulpar. São as denominadas condições irreversíveis que podem chegar a afetar os tecidos periapicais (Kimberly e Byers, 1988), bem como alterações citoquímicas no gânglio trigeminal (Stephenson e Byers, 1995), e em neurónios de segunda ordem no tronco encefálico. Durante a primeira semana, as reações são normalmente confinadas ao dente, mas, de acordo com os estudos de Khayat *et al.*, (1988) nos molares do rato, decorridos 5 dias, as lesões começam a incluir tecidos periapicais e nervos periapicais conduzindo a lesões mais complexas.

É verdade que a polpa está continuamente envolvida na formação da dentina e nas respostas aos estímulos exógenos provocando alterações na estrutura anatômica das paredes da dentina (Pashley, 1996). A dentina terciária pode ser de dois tipos: reaccional ou reparadora. A dentina reaccional é irregular e a sua matriz é formada pelos odontoblastos originais (Smith *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 2002). A dentina terciária do tipo reparador é formada por células indiferenciadas da polpa, originando, na maioria das vezes, um tecido do tipo osteoide (Katchburian e Arana, 2004). Este tipo de dentina é o mais comum entre os mamíferos, sendo denominada ortodentina. Acredita-se que as “células tipo odontoblastos” surjam na polpa adulta após um estímulo adequado e na ausência de células epiteliais. Colocam-se duas hipóteses para explicar esta teoria (Berkovitz *et al.*, 2004): 1) durante a formação inicial da dentina interações epitélio/mesênquima “guiam” algumas células no sentido de se tornarem odontoblastos, permanecendo estas células latentes na polpa até que ocorra um estímulo subsequente para completarem o seu ciclo vital e formarem dentina reparadora; 2) as “células tipo odontoblasto” são diferenciadas a partir de células progenitoras na ausência de qualquer contribuição epitelial. Sendo as moléculas bioativas necessárias para tal diferenciação (ex. citocinas, fatores de crescimento) sintetizadas localmente e libertadas durante o processo inflamatório acompanhando o estímulo (ex. cárie). Várias experiências têm demonstrado que a adição de substâncias ativadoras adequadas na região de exposição pulpar pode aumentar e acelerar clinicamente a formação e reparação da dentina sobre polpas expostas (Berkovitz *et al.*, 2004).

Para além das moléculas indutoras já identificadas, como TGF β 1 (Melin *et al.*, 2000; Lucchini *et al.*, 2002), e da resposta da matriz pulpo-dentinária pelas células pulpares, uma resposta mecânica directa ou um processo de quimio transdução pode também contribuir significativamente para a formação de dentina secundária ou de dentina terciária pelos odontoblastos (Magloire *et al.*, 2004).

Conforme referimos anteriormente, a morfologia dos odontoblastos e dos seus prolongamentos é especializada nas regiões inervadas e difere na dentina reparadora (Byers *et al.*, 1992a; Byers e Sugaya, 1995). De acordo com os estudos de Byers *et al.*, (1990, 1992a, 1992b, 1992c), nas zonas de dentina reparadora, a imunorreatividade pulpar para o receptor de neurotrofina (p75NTR) de baixa afinidade desaparece e as fibras nervosas afastam-se das áreas reparadoras.

Por um lado, continuámos a procurar compreender por que motivo (s) o desgaste observado no nosso estudo passou a ser menos severo após o quarto mês de exposição, e por outro lado, os nossos resultados de FESEM comprovam que existe já uma resposta

do complexo pulpo-dentinário após tão acentuado desgaste das coroas nos animais expostos ao ruído industrial.

Os nossos resultados de FESEM mostraram a existência de uma estrutura em forma de banda na interface entre a dentina e a polpa. Procurámos caracterizar essa estrutura e procedemos à análise elementar dos seus constituintes mineralizados.

Os elementos químicos analisados neste trabalho sob espectroscopia por dispersão de energia (EDS) na dentina circumpulpar foram o carbono (C), oxigénio (O), fósforo (P) e cálcio (Ca). Os picos de ouro (Au) e de paladium (Pd) também foram detetados e devem-se ao revestimento das amostras. Nas apatites biológicas, a razão entre o Cálcio e Fósforo pode ser da ordem dos 1,44 até aos 1,73. Os nossos resultados revelaram que a razão Ca/P na dentina normal é da ordem dos 1,448 e a razão Ca/P na estrutura mineralizada encontrada na interface entre a polpa e a dentina nos dentes expostos é da ordem dos 1,563, sem que as diferenças encontradas sejam significativas. Estes resultados comprovam que a estrutura mineralizada encontrada nos dentes dos animais expostos é formada por hidroxiapatite, e apesar dos valores absolutos do Ca e do P serem diferentes nesta estrutura, a razão Ca/P é similar ao espectro da dentina, pelo que assumimos tratar-se de um dos tipos de dentina reparadora ou mesmo esclerótica.

Os valores do carbono e do oxigénio indicam que esta forma de dentina é mais carbonatada do que a dentina normal. O aumento de carbono nesta estrutura pode dever-se à proximidade da polpa.

A microscopia eletrónica de varrimento (FESEM) mostrou que a estrutura que encontrámos nos animais expostos apresenta poucos túbulos e é mais irregular do que a dentina dita “normal”. Este aspeto morfológico leva-nos a pensar que se trata de uma forma terciária de dentina. Estudos anteriores (Smith *et al.*, 1995) já provaram que a dentina terciária pode ter aspetos muitos variáveis, mas trata-se sempre de uma estrutura irregular que pode ou não apresentar continuidade tubular com a dentina secundária fisiológica.

Considerámos importante saber se os diferentes tipos de dentina apresentam igual resistência ao desgaste.

Na pesquisa bibliográfica que fizemos, não encontrámos dados comparáveis suficientes que nos permitam avaliar a resistência ao desgaste entre a dentina dita normal e a dentina terciária. No entanto, é sabido que a resistência ao desgaste é normalmente proporcional à dureza do tecido e os estudos de Cox *et al.* (1980) sugerem que à medida

que a espessura da dentina reparadora aumenta, aumenta também o KHN (Knoop Hardness Number). Este aspeto pode ajudar a explicar o facto de os nossos resultados mostrarem um desgaste menos severo a partir dos 4 meses de exposição ao ruído.

Nos nossos estudos observámos também um padrão de dentina globular e interglobular num considerável número de dentes molares do rato. A dentina globular está presente em todos os grupos estudados sem que se tivessem observado diferenças na prevalência deste tipo de dentina entre os animais expostos e os controlos.

Como já referimos, por vezes a dentina do manto está separada da dentina circumpulpar por uma zona de formação irregular de dentina denominada dentina globular, que se evidencia pelos espaços entre os glóbulos, os espaços interglobulares. Acredita-se que no Humano esta dentina resulta de uma deficiente mineralização (Avery e Chiego, 2006).

A dentina globular é o resultado da adesão de calcosferitas de fosfato de cálcio dispersas na dentina circumpulpar que vão formando glóbulos de hidroxiapatite cristalina. Estas calcoesferitas continuam a crescer por aposição, formando grandes glóbulos calcificados (Davis, 1988).

A dentina interglobular é a que se localiza nas porções externas da dentina circumpulpar, próxima da dentina do manto. São regiões de matriz de colagénio não calcificada situadas entre os glóbulos das calcoesferitas globulares da dentina circumpulpar (Davis, 1988).

Como se sabe, o ruído industrial é caracterizado por uma elevada intensidade e um amplo espectro de comprimentos de onda. Isso causa tanto o *stress* psicológico como a vibração física das estruturas do corpo.

A mecanotransdução é o processo que converte estímulos físicos em sinais bioquímicos e integra esses sinais nas respostas celulares a nível molecular (Ingber, 2004). Acredita-se assim que as forças físicas podem ter reflexos no micro-ambiente das células (Naruse *et al.*, 2003) e alguns estudos sugerem o envolvimento das integrinas neste processo, ao nível das uniões focais (Ingber, 2003). As integrinas, como ponto de ligação entre a matriz e as células, parecem constituir a via primária para a transmissão de forças para dentro da célula e são vistas como as iniciadoras dos eventos mecano-sensíveis (Huang *et al.*, 2004).

Presume-se que as células em tecidos intactos reajam aos estímulos mecânicos com respostas moleculares que têm por objetivo proteger a integridade do tecido; a resposta das células endoteliais ao *stress* mecânico provocado por fluidos tem sido estudada neste contexto (Malek e Izumo, 1995; Helmke *et al.*, 2001; White *et al.*, 2001).

Os nossos resultados de FEI-SEM mostraram que as células odontoblásticas se unem fortemente umas às outras através das junções entre os corpos, mas também observámos que os prolongamentos odontoblásticos adjacentes estabelecem pontos de união entre si, ao nível da pré-dentina, antes de entrarem nos túbulos dentinários. Este facto vai de encontro aos achados de Carda e Peydro, (2006) que mostraram, no dente humano, a existência de comunicações entre os prolongamentos odontoblásticos.

No caso concreto dos nossos animais, pode existir aqui uma associação entre o impacto direto da pressão acústica sobre os dentes, o aumento das condições causadoras de *stress*, o desgaste dentário e a resposta do complexo pulpo-dentinário.

As nossas amostras dos dentes observadas por FESEM foram secas alcançando o ponto crítico (considerado essencial na preparação de espécimes biológicos para microscopia electrónica). As amostras foram colocadas em HMDS (hexametildisilazina) porque acredita-se que se consegue preservar melhor a malha de colagénio e a microporosidade da superfície de dentina desmineralizada (Perdigão *et al.*, 1995).

No processo de desmineralização para a técnica de *immunogold*, fizemos testes piloto, usando 3 soluções distintas com o objetivo de perceber qual a mais eficaz nos dentes do rato, dado que este procedimento foi realizado em estudos anteriores (Breschi *et al.*, 2003a, 2003b; Ruggeri *et al.*, 2007; Orsini *et al.*, 2008; Ruggeri *et al.*, 2009; Mazzoni *et al.*, 2011), mas em dentes humanos.

Nos dentes desmineralizados com o ácido ortofosfórico conseguimos obter *labeling* das fibras de colagénio do tipo I por *immunogold*, mas as amostras mostraram grande irregularidade e desigualdade das estruturas a observar e a comparar, pelo que não considerámos a melhor solução para as nossas observações.

As amostras tratadas com EDTA, revelaram-se semelhantes às amostras tratadas com o ácido cítrico no que concerne aos aspectos morfológicos, mas não permitiram a marcação, pelo *immunogold*, das fibras de colagénio tipo I. Uma das explicações que avançamos para justificar o insucesso da marcação pelas partículas de ouro nas fibras de colagénio do tipo I é a de que, apesar de verificarmos que o EDTA preserva o aspecto morfológico das amostras de forma excelente, provavelmente não tem a mesma capacidade para “destapar” os epítomos para o antigénio.

Apesar de dispormos de um número limitado de imagens com marcação do colagénio I, pela técnica de *immunogold*, na dentina circumpulpar, os nossos resultados são promissores, dado que foi possível observar aparentes diferenças morfológicas entre os

grupos estudados. As nossas imagens são elucidativas da arquitectura e organização das fibras de colagénio, sugerindo que existe proliferação e desorganização dessas fibras nos grupos expostos ao ruído industrial. Estes resultados não surpreendem porque sabemos que quando as estruturas sólidas vibram, a sua integridade estrutural pode ser ameaçada. O reforço estrutural é muitas vezes a resposta aplicada em estruturas que necessitam de permanecer em ambientes vibratórios (Alves-Pereira e Castelo Branco, 2007). Os estudos anteriores do nosso grupo (Mendes *et al.*, 2010) mostraram que após a exposição prolongada ao RBF, assiste-se a um aumento de fibrose do ligamento periodontal.

Por outro lado, da composição do dente também fazem parte os nanocomponentes que contribuem significativamente para a biomecânica dos tecidos não mineralizados, nomeadamente os proteoglicanos e as fibras de colagénio. Nos tecidos duros, um terceiro componente, sob a forma de cristais de apatite extra e intrafibrilhar contribui também para a resistência às cargas mecânicas (Sunita *et al.*, 2005).

Os proteoglicanos com a matriz extracelular dos tecidos duros e dos tecidos moles formam uma rede com fibras colagénias, donde resulta uma estrutura supramolecular que permite a distribuição das tensões funcionais e das cargas compressivas (Bartold *et al.*, 1988; Murray, 1993).

Estes factos parecem justificar a aparente proliferação das fibras de colagénio I que observámos na dentina circumpulpar dos animais expostos. O colagénio é uma proteína que fornece rigidez mecânica ao tecido e, por este motivo, é muitas vezes considerado o “aço” do corpo humano (Alves-Pereira e Castelo Branco, 2007). O aparente aumento de produção de colagénio nos animais expostos pode ser interpretado como mais uma tentativa de reforço da integridade estrutural por parte do complexo pulpo-dentinário, contudo julgamos ser muito interessante dar continuidade ao estudo dos constituintes não mineralizados do dente, nomeadamente das fibras de colagénio na região da dentina circumpulpar, pela técnica de *immunogold* para que possamos dispor de mais informação.

As estruturas da dentina e da polpa são conhecidas pelas alterações que sofrem com a maturação e a idade. A dentina torna-se mais espessa, a síntese de dentina reparadora oblitera os túbulos dentinários, a polpa torna-se mais fibrosa, menos vascularizada, mais estreita e, eventualmente menos inervada (Fried e Hildebrand, 1981; Byers *et al.*, 1990; Fried, 1992), pois estudos anteriores (Fried, 1992; Swift e Byers, 1992) referem que o envelhecimento da polpa e as alterações na estrutura da dentina com a idade também

contribuem para alterar a distribuição dos nervos e o conteúdo de neuropeptídeos encontrados nos dentes mais velhos.

As alterações dentárias relacionadas com a idade são importantes pela influência que têm na vitalidade da polpa e nos processos de reparação pulpo-dentinária (Murray *et al.*, 2002).

Um dos indicadores das alterações que os dentes sofrem com a idade é exatamente a diminuição do tamanho da câmara pulpar devido à contínua secreção de matriz dentinária pelos odontoblastos, a chamada dentinogênese secundária fisiológica (Solheim, 1992).

Estudos como os de Morse (1991) calcularam que a espessura de dentina aumenta a uma taxa de aproximadamente 0,5µm por dia e esse valor diminui ao longo da vida.

A população celular da polpa ao longo da idade também tem sido alvo de quantificação em vários estudos. Fröhlich (1970), citado por Murray *et al.* (2000) refere que existe uma redução de 50% das células da polpa entre os 20 e os 70 anos. No dente do rato esse valor pode chegar aos 75% na diminuição das células da polpa (Pinzon *et al.*, 1967), e 21% de perda de odontoblastos em comparação com ratos mais jovens (Lavelle, 1968; Lavelle e Moore, 1969). No nosso estudo não quantificámos a celularidade pulpar, mas as nossas imagens histológicas mostram claramente a existência de diferenças na densidade da população celular entre os animais expostos e os animais de controlo.

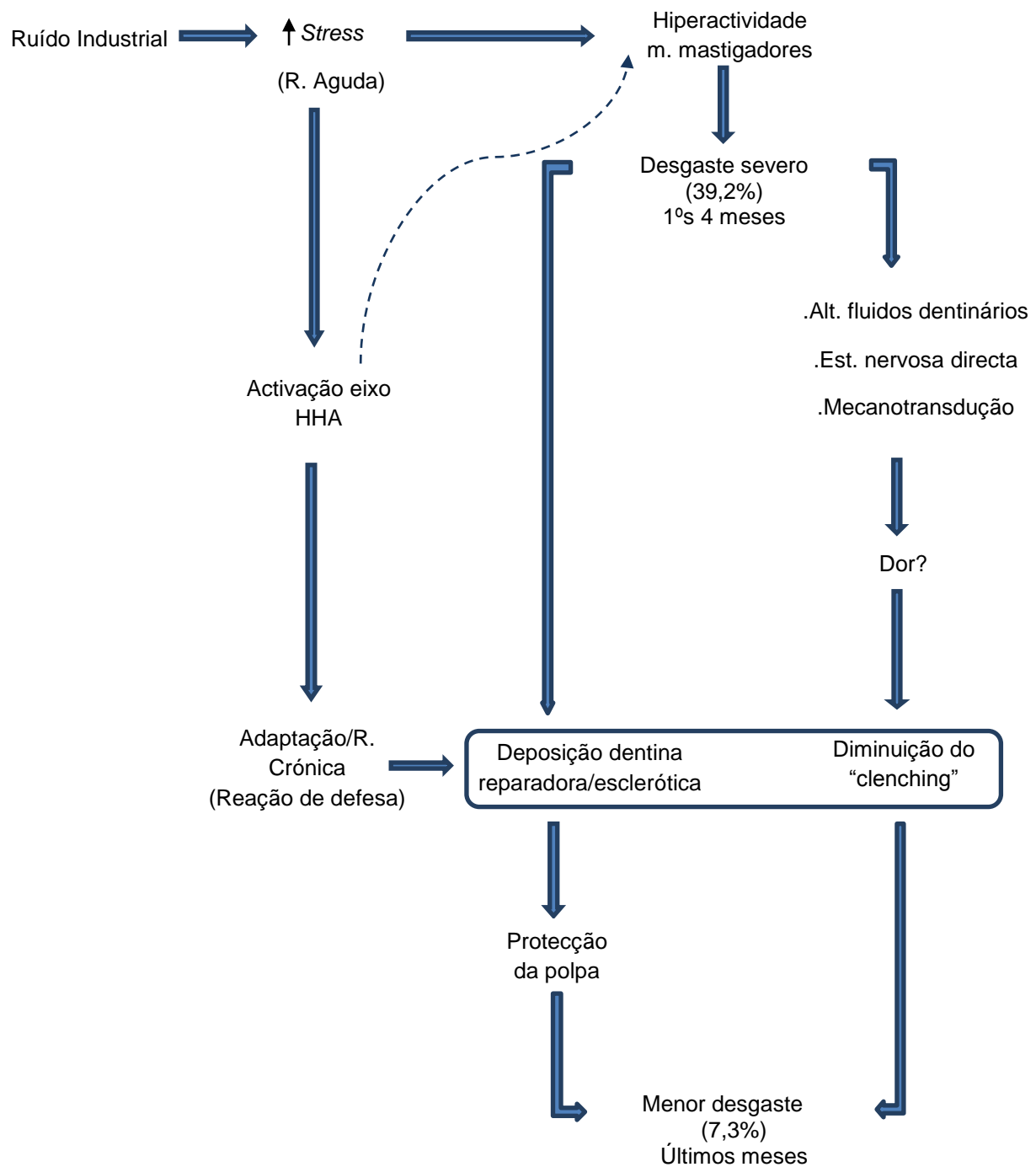
Por outro lado, sabe-se que a capacidade de reparação do complexo pulpo-dentinário depende da densidade de odontoblastos e das células “tipo” odontoblastos (About *et al.*, 2001; Byers e Westenbroek, 2011) e esta parece ser dependente da idade (Murray *et al.*, 2000). Os estudos de Murray *et al.*, (2002) em dentes humanos comprovam que as alterações que ocorrem com a idade são o aumento da espessura da dentina e a diminuição da celularidade.

O tipo de dentina que identificámos nos animais expostos é do tipo reparadora com aspectos morfológicos muito semelhantes à dentina esclerótica, tipicamente relacionada com a idade.

A interpretação do conjunto de resultados do nosso estudo obrigam-nos a pensar que o ruído industrial é para o dente um agente agressor forte, capaz de provocar alterações morfológicas que, em muitos aspectos parecem corresponder aos sinais de envelhecimento dentário.

Desta forma, os nossos resultados parecem sugerir a ocorrência de um envelhecimento precoce nos dentes dos animais expostos ao ruído industrial.

Em síntese, pensamos que pode ocorrer uma sequência de eventos que resumimos no seguinte fluxograma:



VI – CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

O nosso estudo teve por objectivo avaliar, identificar e caracterizar, sob o ponto de vista morfológico, as alterações do dente do rato Wistar exposto ao ruído industrial.

No decurso do nosso estudo, confirmámos que o ruído industrial, rico em componentes de RBF, tem efeitos sobre o dente.

Confirmámos microscopicamente o desgaste das cúspides dos dentes molares ao longo do tempo.

Verificou-se um significativo desgaste dentário nos animais expostos ao ruído. Esse desgaste é mais acentuado nos primeiros 4 meses de exposição.

Constatámos que o desgaste afecta todas as cúspides.

Em microscopia electrónica de varrimento por emissão de campo (FESEM), documentámos alterações na dentina circumpulpar, nomeadamente, a formação de dentina terciária do tipo reparadora.

Os resultados do nosso estudo mostram que o ruído industrial constitui um forte estímulo capaz de causar danos ao nível dos odontoblastos, promovendo a formação de dentina terciária reparadora. De acordo com a evidência dos resultados, este processo pode desencadear um envelhecimento precoce do dente, tanto pelo impacto directo do ruído pela vibração das estruturas, como pelo aumento do *stress* que acelerou o desgaste dentário.

Analisando os nossos resultados, e após a discussão dos mesmos, parece-nos plausível incluir a exposição ao ruído industrial na patogénese do desgaste dentário.

Em síntese, pensamos que, após este trabalho, ficou mais evidente a existência de uma relação entre a exposição ao ruído e os seus efeitos sobre o dente. Esses efeitos não se resumem apenas ao aumento do desgaste dentário, mas também à notória capacidade que este estímulo tem de provocar uma reacção por parte do complexo pulpo-dentinário, com alterações morfológicas ao nível da dentina circumpulpar.

RESUMO

Introdução: O ruído industrial (rico em componentes de baixa frequência - RBF) pode induzir alterações morfológicas e funcionais em vários órgãos e sistemas.

O ruído industrial é caracterizado por uma elevada intensidade e um amplo espectro de comprimentos de onda. O nosso grupo já evidenciou alterações celulares e funcionais causadas pelo RBF na glândula parótida, no periodonto, no miocárdio, no estômago e duodeno.

Um grande número de evidências colocou o ruído como um dos riscos ocupacionais mais comuns do mundo moderno.

Vários estudos têm relacionado a exposição crónica ao ruído industrial com o aumento do *stress* individual. O aperto dos dentes (*clenching*) tem sido associado aos hábitos parafuncionais e ao *stress*. Estas condições aumentam a pressão sobre os tecidos da cavidade oral.

O equilíbrio do aparelho estomatognático é afetado por várias condições, inclusive pelo aumento da tensão dos músculos mastigadores.

O desgaste do dente pode ser um sinal objetivo da existência de hábitos parafuncionais. Por outro lado, sabe-se que o complexo pulpo-dentinário responde às agressões formando dentina terciária. Ao contrário de dentina secundária, que é fisiológica e forma-se ao longo da vida do dente, a formação da dentina terciária está localizada na parede da câmara pulpar correspondente à área do estímulo. A dentina que se forma em resposta a estímulos externos, tais como abrasão, atrito, cárie, entre outros, é denominada de dentina terciária reativa. Os fatores externos estimulam o aumento da taxa de secreção de matriz dentinária pelos odontoblastos existentes.

Na presente tese admitimos como hipótese que o dente, como órgão que reflecte e reage aos desequilíbrios do sistema estomatognático, possa também apresentar alterações após a exposição ao ruído industrial.

Esta tese teve por objectivos a identificação e caracterização morfológica dos efeitos do ruído industrial sobre o dente ao longo do tempo, nomeadamente:

- Avaliar e caracterizar a evolução do desgaste nas coroas dos molares, em função do tempo de exposição ao ruído industrial.
- Identificar e caracterizar as alterações ultraestruturais da dentina circumpulpar.

Métodos: Foram usados 40 ratos Wistar de um produtor espanhol (Charles River Laboratories España SA, Espanha). Todos os animais foram alimentados com ração padrão e tiveram livre acesso à água. Foram mantidos em condições normais e colocados em grupos de dois dentro de uma caixa de plástico (42x27x16 cm), com uma cobertura de aço. Os animais foram tratados de acordo com as leis da União Europeia e as leis portuguesas para estudos experimentais.

Os animais foram expostos ao ruído industrial durante 1 a 7 meses, em diferentes períodos de tempo, de forma a simular o horário laboral normal (8 horas/dia, 5 dias/semana com os fins-de-semana em silêncio). 30 animais foram divididos em três grupos de 10 animais cada e sacrificados após 1, 4 e 7 meses de exposição ao ruído. Os restantes 10 animais foram mantidos em silêncio para controlo e sacrificados com as mesmas idades dos animais dos grupos expostos.

O ruído de uma fábrica têxtil do norte de Portugal foi usado para simular o ambiente ocupacional a que os operários estão submetidos. O ruído presente na sala foi gravado e reproduzido de acordo com o procedimento utilizado por Oliveira et al., (2005, 2009). Os animais foram sacrificados com uma injeção intraperitoneal letal de pentobarbital de sódio.

Foram extraídos oito dentes molares de cada animal. 126 dentes foram preservados em formol tamponado a 10% e processados para microscopia de luz. Utilizou-se a coloração de hematoxilina-eosina para observação histológica. Em cada corte histológico foi medida a área das três cúspides principais de cada dente. Todas as imagens das seções foram obtidas com uma ampliação de 40x. A análise das imagens foi realizada com o software LAS (Leica Application Suite).

A análise estatística foi realizada com o software SPSS 19.0. Todos os testes estatísticos foram aplicados ao nível de significância de 5%.

Para a microscopia electrónica de varrimento com emissão de campo (FESEM), os dentes foram fraturados longitudinalmente (no sentido mesio-distal), de modo a expor a dentina circumpulpar. As amostras foram observadas com um microscópio JEOL JSM-7001F.

Foi feita a análise elementar na dentina circumpulpar por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Num menor número de amostras foi usada a técnica de *immunogold* para a marcação das fibras de colagénio do tipo I.

Resultados: A observação dos dentes molares em microscopia ótica permitiu comprovar o maior desgaste nas cúspides dos molares expostos ao ruído industrial comparativamente com os molares dos grupos de controlo.

Nos grupos de controlo, a perda total da coroa desde o primeiro ao sétimo mês foi de 17,3%. Nos grupos expostos, a perda total da coroa desde o primeiro ao sétimo mês foi de 46,5%. Estas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,001$) sendo que, entre o primeiro e o quarto mês, ocorre o desgaste mais severo (39,2%),

Nos animais dos grupos expostos ao ruído industrial, as observações de FESEM mostraram a presença de uma estrutura em forma de banda entre a dentina e a polpa. A banda foi observada nas paredes dos cornos pulpares e no teto da câmara pulpar com espessura de 2,0 μm a 6,0 μm . A estrutura observada, quase compacta, não apresenta regular continuidade com os túbulos dentinários.

Os nossos resultados de EDS revelaram que a razão entre o cálcio (Ca) e o fósforo (p) na dentina normal é da ordem dos 1,448. E a análise elementar por EDS na estrutura circumpulpar detetada revelou tratar-se também de uma forma de hidroxiapatite com a razão Ca/P na ordem dos 1,563 e sem diferenças significativas em relação à dentina.

Discussão: Os nossos resultados mostraram que a taxa de desgaste dentário é maior nos animais expostos ao ruído do que nos animais de controlo. O desgaste dentário é uma condição irreversível com etiologia multifatorial e pode resultar de causas fisiológicas e/ou patológicas. Na etiologia do desgaste dentário, os hábitos parafuncionais e o *stress* assumem um papel muito relevante. Na verdade, o bruxismo tem sido apontado como o hábito parafuncional mais associado ao desgaste dentário excessivo. Na etiologia multifatorial do bruxismo encontramos o *stress* emocional entre as causas mais importantes. Os estudos sugerem que o *stress* induz hiperatividade dos músculos mastigadores, nomeadamente dos músculos masseteres do rato, resultando em hábitos parafuncionais, como o bruxismo.

Nos nossos estudos parece existir uma correlação entre o *stress* provocado pelo ruído industrial e o aumento do desgaste dentário, uma vez que, de acordo com os resultados da análise estatística, nos animais submetidos ao ruído industrial o desgaste dentário que encontrámos é significativamente maior ($p < 0,001$) do que nos grupos de controlo.

Evidenciámos que o desgaste dentário observado não é idêntico ao longo do tempo de exposição, i.e., é maior entre o primeiro e o quarto mês de exposição. De acordo com os nossos resultados, a partir do quarto mês de exposição, o desgaste dentário continua a acontecer, mas de forma menos rápida.

Pensamos que, por um lado, pode ocorrer um processo de adaptação e de habituação do organismo às circunstâncias causadoras de *stress*, e, paralelamente, um mecanismo de defesa à dor bem como os efeitos da resposta dinâmica do complexo pulpo-dentinário, com a formação de dentina terciária, devem ser considerados.

No caso da exposição crónica, o agente de *stress* evoca com o tempo uma resposta neuro-hormonal cada vez mais discreta.

Por outro lado, pode existir uma atitude defensiva para evitar a dor. Os estudos mostram que quando uma força excessiva é exercida sobre o dente, é ultrapassada a tolerância fisiológica que o ligamento periodontal tem para se adaptar e o reflexo nociceptivo é ativado.

O nosso estudo mostra que nos animais expostos, a taxa de destruição dos tecidos duros nos primeiros 4 meses de exposição ao ruído industrial foi de 39,2% da área total da coroa dos molares. Com estes dados, não é difícil de entender que a dentina e a polpa estão mais suscetíveis e/ou expostas a estímulos diretos e/ou indiretos capazes de provocar dor.

Paralelamente, outros aspetos devem ser levados em linha de conta, como a reconhecida capacidade de resposta do complexo pulpo-dentinário, por norma, formando dentina terciária, uma vez que o aumento da espessura de dentina funciona como uma proteção para a polpa.

Os nossos resultados comprovam que o desgaste dentário encontrado parece repercutir-se noutras alterações ao nível da estrutura do dente, nomeadamente na dentina circumpulpar indo de encontro aos vários estudos que mostraram que o dente responde aos agentes agressores através do complexo pulpo-dentinário.

Os nossos resultados de FESEM mostraram a existência de uma estrutura em forma de banda na interface entre a dentina e a polpa. Procurámos caracterizar essa estrutura e procedemos à análise elementar dos seus constituintes mineralizados por EDS. Os resultados de EDS mostraram tratar-se de uma forma de hidroxiapatite.

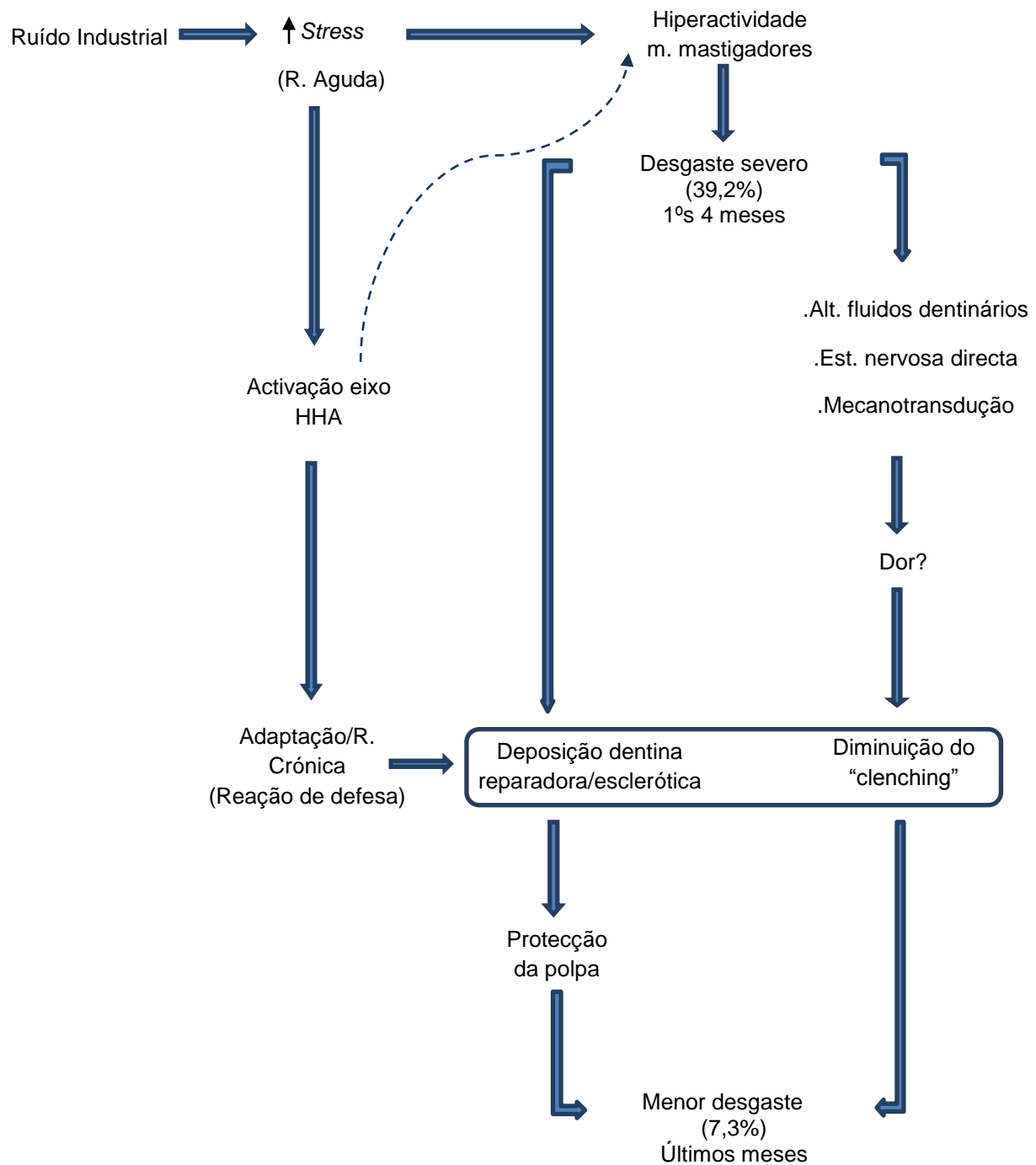
A microscopia eletrónica de varrimento (FESEM) mostrou que a estrutura que encontrámos nos animais expostos apresenta poucos túbulos e é mais irregular do que a dentina dita “normal”. Este aspeto morfológico leva-nos a pensar que se trata de uma forma terciária de dentina. Estudos anteriores já provaram que a dentina terciária pode ter aspetos muitos variáveis, mas trata-se sempre de uma estrutura irregular que pode ou não apresentar continuidade tubular com a dentina secundária fisiológica.

O tipo de dentina que identificámos nos animais expostos é do tipo reparadora com aspetos morfológicos muito semelhantes à dentina esclerótica, tipicamente relacionada com a idade.

A interpretação do conjunto de resultados do nosso estudo obrigam-nos a pensar que o ruído industrial é para o dente um agente agressor forte, capaz de provocar alterações morfológicas que, em muitos aspetos parecem corresponder aos sinais de envelhecimento dentário.

Desta forma, os nossos resultados parecem sugerir a ocorrência de um envelhecimento precoce nos dentes dos animais expostos ao ruído industrial.

Em síntese, pensamos que pode ocorrer uma sequência de eventos que resumimos no seguinte fluxograma:



Conclusões: Os resultados do nosso estudo mostram que o ruído industrial constitui um forte estímulo capaz de causar danos ao nível dos odontoblastos, promovendo a formação de dentina terciária reparadora. De acordo com a evidência dos resultados, este processo pode desencadear um envelhecimento precoce do dente, tanto pelo

impacto directo do ruído pela vibração das estruturas, como pelo aumento do *stress* que acelerou o desgaste dentário.

Os nossos resultados e a crescente exposição aos agentes causadores de ruído ambiental parecem justificar a inclusão deste estímulo na patogénese do desgaste dentário.

ABSTRACT

Introduction: Industrial noise (rich in low frequency components-LFN), can induce morphological and functional changes in various organs and systems.

Industrial noise is characterized by a high intensity and a broad spectrum of wavelengths.

Our group found evidence of LFN direct cellular lesion with functional repercussions in acinar salivary glands, in the periodontium, in the myocardium, in the stomach and duodenum.

A large body of evidence has placed noise as one of the most common occupational hazards of the modern world. Several studies have linked chronic exposure to industrial noise (IN) with increased individual stress.

Clenching of the teeth has been associated with parafunctional habits and stress. These conditions put pressure on the muscles, tissues, and other structures around the jaw.

The balance of the stomatognathic apparatus is affected by various conditions, including the increased stress, for example, by the tension to the jaw muscles. Tooth wear can be an objective sign of the existence of parafunctional habits.

On the other hand, it is known that the pulp-dentin complex responds to injuries forming tertiary dentin. Unlike secondary dentin, which is physiological and forms throughout the vital life of the tooth, the formation of tertiary dentin is localized in the pulp chamber wall corresponding to the area of the stimulus. The tissue that is deposited on the pulpal aspect in response to external stimuli, such as abrasion, attrition, caries, ultra-sonic scaling, among others, is called reactionary tertiary dentin. These external factors stimulate an increased rate of matrix secretion by the existing odontoblasts.

In this thesis we hypothesized that the tooth is an organ that is affected and reacts to imbalances of the stomatognathic system, and may also show changes after exposure to industrial noise.

The aim of this thesis was to evaluate the effects of industrial noise on the teeth wear over time, and understand the consequences of IN exposure on the circumpulpar dentin of Wistar rats namely to identify and characterize the alterations.

Methods: We used 40 male Wistar rats, from a Spanish producer (Charles River Laboratories España SA, Spain). All animals were fed with standard rat food and had free access to water. They were kept under normal conditions and placed in groups of two inside a plastic box (42x27x16 cm) with a steel cover. The animals were treated according to the laws of the European Union and the Portuguese laws for experimental studies.

Noise exposure

The environmental noise of a cotton-mill room from a large textile factory of Northern Portugal was used as the paradigm of the occupational noise. The noise present in this cotton mill room was recorded and reproduced according to the procedure used by Oliveira *et al.*, (2005, 2009).

30 rats were divided into three groups of 10 animals each and submitted to industrial noise for 1, 4 and 7 months, according to an occupationally simulated time schedule (8 h/day, 5 days/week, and weekends in silence). The remaining 10 animals were used as age-matched controls (no noise exposure) and sacrificed after 1, 4 and 7 months.

The rats were sacrificed with a lethal intraperitoneal injection of sodium pentobarbital.

We extracted the first and the second upper and lower molars of each animal. 126 teeth were preserved in 10% buffered formalin, and processed for light microscopy. Sections were stained with Hematoxylin-eosin (H-E).

The area of the three main cusps of each tooth was measured: the mesial cusp, the central cusp and the distal cusp.

Measurements

All the images of the sections were obtained with a magnification of 40x using a Leica DM LB microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany).

The data analysis was performed with the LAS (Leica Application Suite) software.

We measured individual cusp base areas by tracing the outline of the cusp, following the occlusal surface to the tangential line cross the highest point of the pulp horn.

All the measurements were performed by the same observer. Each blinded measurement was repeated 3 times, in three different days, and the average was calculated and used to statistically analyze the data.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All statistical tests were applied at the significance level of 5%.

A two-way ANOVA model was fit to the data after checking model assumptions, in which the dependent variable was defined as the average of the 3 cusp areas. The two independent factors were Time (1, 4 and 7 months) and Group (Exposed and Control groups). The assumption of homogeneity of variance was checked using the Levene test. Concerning normality of the distribution of the dependent value, and given the small size of the classes, it was sufficient to confirm the symmetry of the variable, as the F ratio is robust in such conditions.

For Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) the teeth were longitudinally fractured (in the mesio-distal direction) in order to expose the pulp chamber and channels and also the circumpulpar dentin. The samples were then processed for observation by Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM) under a microscope JEOL JSM-7001F.

Elemental analysis of circumpulpar dentin were performed by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS).

In a smaller number of samples was used immunogold technique for labeling of collagen I fibers.

Results: The H-E sections of the control groups 1 and 4 displayed a normal appearance of the teeth, namely intact cusps without signs of wear.

The teeth of control group 7 showed a total crown loss of 17.3% compared to control 1 and of 17.5% when compared to control group 4.

Wear was observed in the sections from the groups exposed to noise.

Regarding time variations, the planned contrasts show that, between month 1 and 4, the observed variation in control cusp areas (0.3% increase) is significantly different ($p < 0.001$) from that observed in the exposed group (39.2% decrease). Between month 4 and month 7, the observed variation in cusp areas in the control group (17.5% decrease) is not significantly differently ($p = 0.212$) from the exposed group (12.0% decrease).

From the magnitude and statistical significance of the contrasts, the most noticeable differences occurred between month 1 and 4.

The total crown loss from month 1 to month 7 was a 17.3% decrease in the control group and 46.5% decrease in the exposed group, and the differences between these variations were statistically significant ($p < 0.001$).

FESEM observations showed a 2.0 to 6.0 μm -dense mineral band between dentin and the pulp, in the roof chamber and pulpar horn of all the animals exposed to IN. No such structure was found in the control animals. The mineralized structure did not have a regular continuity with the tubules. This almost compact structure had a few tubules where the odontoblasts processes could be observed embedded within the mineral structure and also collagen fibers trapped inside this mineral structure and projection-like “tags”.

EDS analysis of this band revealed that it was hydroxyapatite and that the Ca/P ratio was similar to dentin.

Discussion: Our results show a significant tooth wear in animals exposed to industrial noise. Tooth wear may result from physiological or from pathological conditions. It is an irreversible condition and, unless the causes are detected and dealt with, it may progress in severity with age. Even though dental wear is a multifactorial condition, the mechanical causes and parafunctional habits are the most reported in the literature. Among the deleterious habits, bruxism, associated with tooth wear, is the most commonly reported.

Bruxism is an oral habit characterized by a rhythmic activity of the temporomandibular muscles that causes a forced contact between dental surfaces. It is accompanied by tooth clenching or grinding. The grinding of teeth has long been held as one physical manifestation of stress and anxiety.

Our study revealed a serious problem of tooth wear amongst the rats exposed to IN.

The occlusal wear found in the aged-matched controls is certainly related to the normal ageing process as the animals were fed the same food and were in a silent environment.

There was a noticeable and significant crown wear rate in the group exposed to IN for 4 months, which resulted in a 39.2% reduction in the average areas of the molar cusps. Crown loss rate was attenuated in the 7 month group.

Other studies have recognized the relationship between LFN and stress. In most studies, the relationship between noise as a “stressful” agent and the activity of the muscles of mastication suggests that the prevalence of dental abrasion in individuals subjected to noise is very high. Studies in workers of the textile industry reported significantly higher probability ratios of teeth with abrasion in the groups exposed to noise in comparison with the control group.

Our results show that the tooth wear correlates with exposure time and is significantly higher in the first 4 months of exposure, probably due to mechanisms of adaptation/habituation, defense (periodontitis, pain), to continuous deposition of reactionary tertiary dentin, or to a combination of all these factors.

In fact, we think that stress and the stress adaptation mechanisms must be considered. The first stress response induced pathway is the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which promotes the liberation of hormones that stimulate the release of glucocorticoids from the adrenal cortex.

The second response pathway is the sympathetic, promoting the liberation of adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla.

Several studies clearly separate acute and chronic stress conditions, referring an adaptation/habituation state.

Habituation is defined as a behavioral response decrement that results from repeated stimulation and that does not involve sensory adaptation/sensory fatigue or motor fatigue. It is also known that the magnitude of the HPA activation occurring in response to a stressor declines with repeated exposure to that same stressor.

These studies may explain our results, specifically the decline in tooth wear with exposure time. Moreover, we cannot exclude a defensive response to pain or discomfort, caused by wear, with less contact force between teeth.

Our results also show the presence of a band-like structure between the pulp and dentin in the roof chamber of the teeth of IN exposed animals.

We have to consider the teeth response to injuries. Repairing, tertiary dentin formation may also play a role, concerning our results.

Stimulation of odontoblasts induces an adaptive response characterized by altered functionality and synthesis of modified dentinal matrix. The degree of each stimulus influences the odontoblast response differently. This remarkable adaptive capacity of the dynamic pulp-dentin complex is reflected in the formation of tertiary dentin. Compared with physiological dentin, the structure of tertiary dentin can be very variable in its morphology, its structure can contain fewer, irregular and constricted dentinal tubules.

Some studies distinguish two types of tertiary dentin: reactionary dentin being the tertiary dentin matrix secreted by surviving post-mitotic odontoblastic cells, in response to appropriate stimuli; and reparative dentin as a tertiary dentin matrix secreted by new

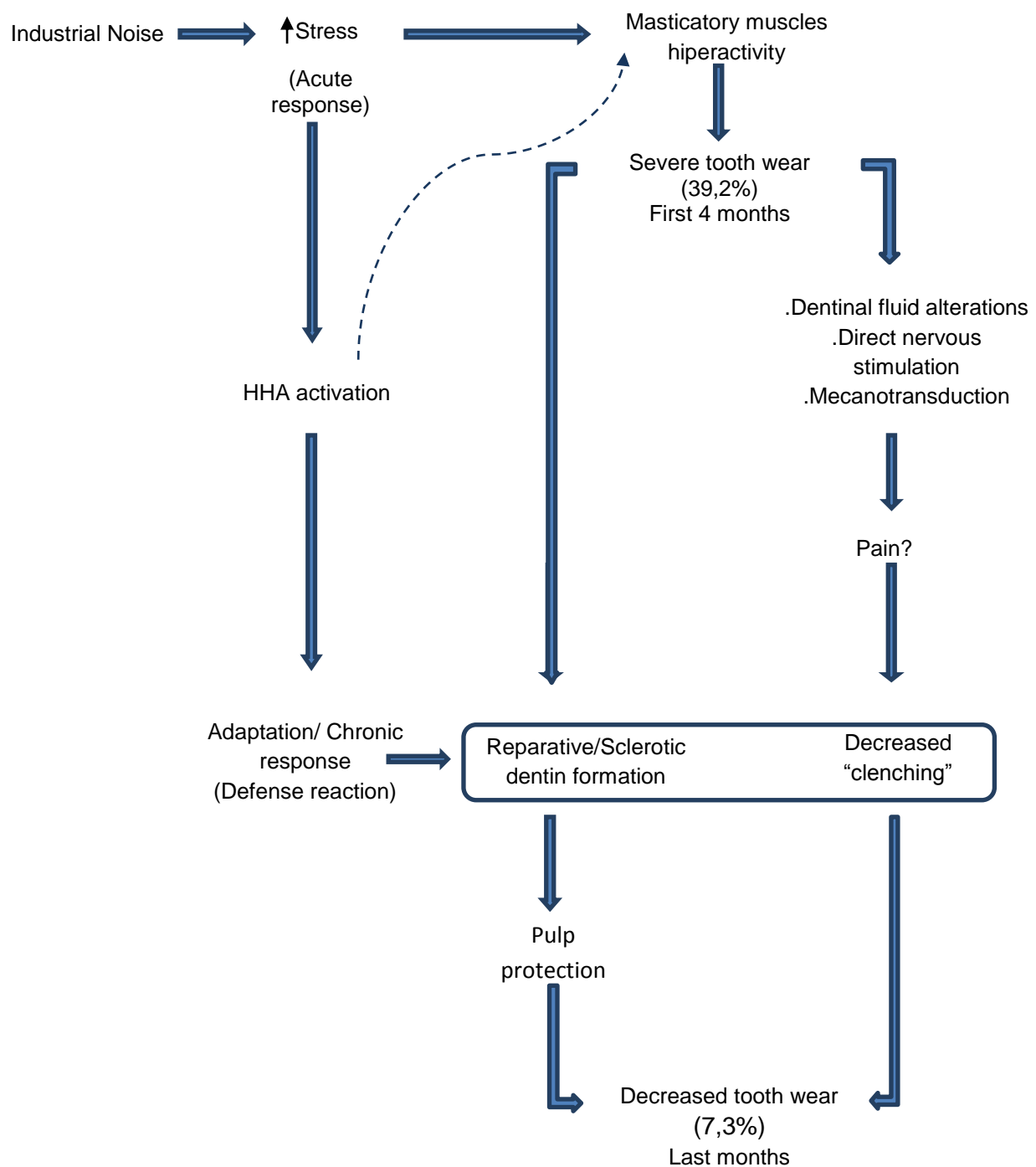
odontoblast-like cells, after the death of the original odontoblasts, responsible for primary and secondary dentin secretion.

Under these assumptions reactionary dentin is formed responding to “moderate” stimuli and reparative dentin is formed responding to “strong” stimuli.

EDS analysis, showed that the band-like mineral structure has a composition similar to hydroxyapatite. FESEM results show that the observed reparative form of tertiary dentin does not have tubular continuity with physiological secondary dentin matrix. So the band-like structure that we have found is probably tertiary reparative dentin, produced in response to the exposure to IN, by odontoblast-like cells.

Our spectroscopy results also revealed a Ca/P mol ratio of 1.448 in the normal dentin and a Ca/P mol ratio of 1.563 in the other circumpulpar mineralized structure, without significant differences. We cannot discard other types of dentin, like sclerotic dentin, that can have an increased mineral component. Dentinal sclerosis is a multifactorial event, due both to an increase in the thickness of peri-tubular dentin and to intra-tubular precipitation of calcium salts associated with mineralization of the organic structures present in the lumen. This type of dentin is more frequently found in older teeth. In our study, we could not determine the mechanism that caused the mineral band formation. However, the morphologic aspect observed in our FESEM images shows that the mineral formation began from the inside of the tubules. Moreover, our results suggest that this mineralization occurred quickly, because we can observe the collagen fibers trapped inside the mineral structure. Although there are no significant differences in the mineral components, we have an atypical mineral formation and there is an increase in the amount of carbon in the mineral band, therefore we cannot exclude that the mineral band is sclerotic dentin. This could be justified by proximity to the pulp causing a sudden mineralization of the band. It is known that sclerotic dentin is related to the aging of the teeth.

In the following diagram we try to summarize our findings and explanations:



Conclusions: Our results, and the growing presence of noise in the environment, point to the consideration of this stimulus in the pathogenesis of tooth wear.

In conclusion, our results clearly show that IN should be acknowledged as a very strong stimulus, able to cause an injury to odontoblasts and, to the formation of reparative tertiary dentin, in a process that may accelerate the aging of the teeth, either by direct impact of acoustic pressure pulsations or by increased stress and dental wear.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

